



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/62, C07K 14/705, 16/00, A61K 38/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/58693 (43) Date de publication internationale: 18 novembre 1999 (18.11.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01147</p> <p>(22) Date de dépôt international: 12 mai 1999 (12.05.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/06213 14 mai 1998 (14.05.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GOROCHOV, Guy [FR/FR]; 9, rue du Dr Laurent, F-75013 Paris (FR). PIQUERAS, Bernard [FR/FR]; 173 ter, rue de Charenton, F-75012 Paris (FR). LE DOUSSAL, Jean-Marc [FR/FR]; 20, rue Constantinople, F-75008 Paris Cedex (FR). DEBRE, Patrice [FR/FR]; 3, rue Jacob, F-75006 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataires: BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
(54) Title: COMPLEX FORMED BY A PEPTIDE AND A MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX AT THE SURFACE OF PHAGES		
(54) Titre: COMPLEXE FORMÉ D'UN PEPTIDE ET D'UN PRODUIT DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE A LA SURFACE DE PHAGES		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a micro-organism, preferably a phage, having at its surface a complex consisting of a peptide (P) and a major histocompatibility complex (MHC). More particularly, it concerns a method for expressing a complex formed by a peptide (P) and a major histocompatibility complex (MHC) in a micro-organism so as to produce said complex and present it at a phage surface. The invention also concerns the resulting complexes and their uses for marking, sorting or modulating T cell activity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>. The invention further concerns the use of the resulting P-MHC complexes for constituting banks of micro-organisms useful for screening and isolating antigenic peptides recognised by T cells.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un micro-organisme, préférentiellement un phage, présentant à sa surface un complexe formé d'un peptide (P) et d'un produit du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un procédé d'expression d'un complexe formé d'un peptide (P) et d'un produit du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) dans un micro-organisme afin de produire ledit complexe et de le présenter à la surface d'un phage. La présente invention se rapporte encore aux complexes ainsi obtenus et à leur utilisation pour marquer, trier, ou moduler l'activité de cellules T <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>. La présente invention a aussi pour objet l'utilisation des complexes P-CMH obtenus pour la constitution de banques de micro-organismes utiles pour cribler et isoler des peptides antigéniques reconnus par des cellules T.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

COMPLEXE FORME D'UN PEPTIDE ET D'UN PRODUIT DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE A LA SURFACE DE PHAGES

5

La présente invention concerne un micro-organisme, préférentiellement un phage, présentant à sa surface un complexe formé d'un peptide (P) et d'un produit du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un procédé d'expression d'un complexe formé d'un peptide (P) et d'un produit du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) dans un micro-organisme afin de produire ledit complexe et de le présenter à la surface d'un phage.

La présente invention se rapporte encore aux complexes ainsi obtenus et à leur utilisation notamment pour le criblage de peptides reconnus par les cellules T.

Les cellules T jouent un rôle essentiel dans l'immunité, en particulier dans l'auto-immunité, la surveillance anti-tumorale, le rejet de greffe et dans la protection contre les infections par des virus et d'autres pathogènes intracellulaires. Grâce à leur récepteur à l'antigène (1) hautement variable, les cellules T reconnaissent les peptides antigéniques (P) associés aux produits du complexe majeur d'histocompatibilité (2), et présentés à la surface des cellules. Les peptides antigéniques comportent en général 8 à 12 acides aminés (3) issus de l'apprêtage intracellulaire des protéines. Il y a deux types majeurs de CMH : classe I et classe II. Les CMH de classe I (CMH-I) sont composés d'une chaîne α de trois domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), d'une région

transmembranaire et d'une région cytoplasmique. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont polymorphes. La chaîne β , ou encore $\beta 2$ -microglobuline, non polymorphe, s'associe spontanément à la chaîne α et est nécessaire à l'obtention d'un complexe stable. Les CMH de classe II (CMH-II) sont composés de deux chaînes α et β qui s'associent spontanément en hétérodimères. Chaque chaîne comporte deux domaines extracellulaires, ($\alpha 1$ et $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$), une région transmembranaire et d'une région cytoplasmique. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ sont polymorphes.

La diversité des peptides antigéniques qui peuvent s'associer à chaque allèle du CMH, ainsi que l'extrême polymorphisme du CMH, crée ainsi une très grande diversité de complexes P-CMH potentiellement reconnus par les cellules T. Par ailleurs, l'interaction entre le complexe P-CMH et le TCR est de faible affinité et il est difficile de l'observer en dehors d'un contact cellulaire qui implique des interactions multivalentes et d'autres molécules accessoires (4).

Ces propriétés rendent difficile d'une part la production de P-CMH sous une forme homogène, stable et capable de se fixer spécifiquement aux cellules T, d'autre part la mise en œuvre de procédé moléculaires de criblage de la spécificité d'une cellule T associée à une maladie particulière.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour produire de tels complexes P-CMH. Selon une première méthode, les domaines extracellulaires du CMH sont produits sous forme dénaturée dans la cytoplasme d' *E. Coli*, purifiés, repliés in vitro et enfin associés avec un peptide antigénique (5). Selon une deuxième méthode, la stabilité

des complexes P-CMH est améliorée par l'association des domaines extracellulaires α et β au sein une même chaîne protéique (6, brevet WO9640944), ou à l'aide de domaines de dimérisation (7, brevet WO9806749). De façon similaire, selon une troisième méthode, le complexe P-CMH est stabilisé en reliant le peptide antigénique lui-même à l'un des domaines du CMH au sein d'une seule chaîne protéique (8, 26, brevets WO9604314, US5734023, WO9640944). Ces méthodes permettent d'obtenir des quantités non négligeable de complexes P-CMH, mais les procédés de fabrication et de purification sont relativement complexes, soit que les différents éléments doivent être associés in vitro, soit que la production mette en jeu des cellules eucaryotes. De plus, pour obtenir une liaison stable des P-CMH aux cellules T spécifiques, il est encore nécessaire de créer des oligomères de P-CMH, par exemple en utilisant l'avidine tetramérique (9), ou des domaines d'oligomérisation (WO 9803552, WO9806749). De tels composés sont utiles à détecter et à trier les cellules T spécifiques d'un antigène dans un mélange, comme par exemple le sang, ou à stimuler spécifiquement cette même population de cellules à des fin vaccinales ou immunothérapeutiques.

La structure moléculaire et la diversité des P-CMH rend également difficile le criblage de la spécificité des cellules T associées à une maladie particulière. Les procédés de production de P-CMH décrits ci-dessus sont peu adaptés à cet usage, dans la mesure où ils ne permettent de produire, au coup par coup, qu'un petit nombre de complexes P-CMH contenant un peptide antigénique de séquence définie et un allèle particulier du CMH. La recherche de peptides antigéniques reste donc à l'heure actuelle une procédure complexe impliquant entre autres techniques, la mise en présence des cellules T avec des cellules eucaryotes présentatrices, exprimant un ou des allèles particuliers du

CMH. Dans une première méthode, les peptides antigéniques candidats sont ajoutés dans l'essai sous forme de peptides synthétiques solubles (10). Dans une deuxième méthode, dite génétique (11) ils sont ajoutés sous forme d'ADN, d'ADNc ou de leurs fragments transfectées dans les cellules présentatrices. Les transfectants sont ensuite criblés pour leur capacité à stimuler les cellules T. Dans une méthode équivalente, ils sont ajoutés par l'intermédiaire de micro-organismes capables d'être phagocytés par les cellules présentatrices (12). Aucune de ces méthodes ne permet de cribler directement les complexes P-CMH d'après leur capacité à se fixer au TCR en l'absence de cellule présentatrices. Par ailleurs, elle ne permettent pas de cribler un très grand nombre de peptides.

15

On connaît par ailleurs dans l'art antérieur la méthode dite du "phage display", décrite par exemple dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le No. WO9702342. Cette méthode permet d'associer une séquence d'ADN à son produit d'expression au sein d'une même particule de phage. Cette caractéristique permet le criblage d'une grande diversité de ligands d'après leur capacité à fixer de façon stable un récepteur d'intérêt (13). Le système du phage display a été utilisé pour présenter de petits peptides d'environ 10 acides aminés à la surface des bactériophages (14). Des molécules de taille plus importantes ont été également exprimées à la surface des bactériophages, notamment des anticorps (15). Cependant, la manipulation des bactériophages en vue de la présentation de protéines de taille importante à leur surface pose de nombreux problèmes, liés à l'assemblage des protéines et à leur présentation sur l'enveloppe du phage (16), ou encore à leurs propriétés de sécrétion ou de repliement dans le périplasme bactérien (17).

35

Dans un premier aspect, la présente invention concerne un micro-organisme, préférentiellement un phage, génétiquement modifié de manière à présenter un ou plusieurs
5 complexes P-CMH à sa surface.

Dans un autre aspect, la présente invention se rapporte à un procédé d'expression d'un complexe P-CMH dans un micro-organisme afin de produire ledit complexe et de le présenter à la surface de phages, les deux éléments dudit
10 complexe pouvant être liés de manière covalente ou non.

Plus particulièrement la présente invention envisage deux modes de réalisation du procédé. Dans un premier mode, la demanderesse envisage l'expression des complexes P-CMH sous forme soluble. Dans un second mode,
15 elle envisage l'expression desdits complexes à la surface de phages.

Dans un autre aspect, la présente invention se rapporte également à l'utilisation de complexes P-CMH obtenus selon l'un ou l'autre des modes de réalisation du
20 procédé de l'invention pour marquer, trier ou moduler l'activité de cellules T *in vitro* ou *in vivo*.

Dans un dernier aspect, la présente invention se rapporte également à un procédé d'utilisation des complexes P-CMH obtenus selon l'un ou l'autre des modes de réalisation
25 du procédé de l'invention pour la préparation de banques (ou bibliothèques) de micro-organisme pour cribler et isoler des peptides antigéniques reconnus par des cellules T.

Les objets et les avantages de l'invention pourront être plus clairement appréciés à la lumière des
30 descriptions détaillées qui suivent.

La présente invention concerne en premier lieu un micro-organisme génétiquement modifié de manière à
35 produire un complexe P-CMH et à le présenter à sa surface.

Les principaux avantages par rapport aux complexes P-CMH de l'art antérieur résident dans le fait que les complexes présentés à la surface d'un micro-organisme permettent l'accès direct à la séquence nucléotidiques codant pour les peptides et le CMH présent, puisque cette séquence est présente à l'intérieur du micro-organisme. De manière préférée, les micro-organismes généralement utilisés sont des bactéries, des levures ou des virus. La présente invention est donc relative tout particulièrement à un phage présentant à sa surface un ou plusieurs complexe(s) P-CMH.

Les micro-organismes objet de la présente invention sont obtenus par l'expression du ou des complexe(s) P-CMH selon le procédé tel que décrit ci-dessous. L'invention concerne donc aussi un procédé d'expression d'un complexe P-CMH dans un micro-organisme comprenant les étapes suivantes :

a) la préparation d'une séquence nucléotidique comprenant d'une part une séquence codant successivement pour un peptide signal, un peptide antigénique, un peptide de liaison, un ou des domaines extracellulaires d'un ou plusieurs produits du CMH, et d'autre part une séquence fonctionnelle.

b) le clonage d'une séquence nucléotidique obtenue en (a) dans un vecteur permettant l'expression de ladite séquences dans un micro-organisme.

c) la transfection d'un micro-organisme avec un vecteur obtenus à l'étape (b),

d) l'induction de l'expression du produit de la séquence nucléotidique par tout moyen approprié.

Par peptide signal, il faut entendre un peptide permettant l'export de la protéine de fusion dans le périplasma, ou il est clivé (18). Les conditions chimiques régnant dans le périplasma sont en effet favorable au bon

repliement des domaines du CMH (5). Il est possible d'utiliser les peptides signal naturels présents dans les protéines bactériennes ou les protéines du bactériophage fd g3p et g8p (19), ainsi que les peptides signal améliorés
5 obtenus par mutagenèse et sélection appropriée (20). Il est en surtout primordial de déterminer précisément le site de clivage entre le peptide signal et le peptide antigénique. La modification, l'ajout ou la soustraction de résidus à l'extrémité N-terminale des peptides antigéniques peut en
10 effet affecter les propriétés antigéniques du peptide (3). A cet effet, la séquence de l'ADN du peptide signal doit être modifiée de façon à insérer silencieusement un site de clonage adapté à son assemblage avec les autres éléments.

De manière avantageuse, le peptide signal
15 utilisé est le peptide signal de la protéine pectine lyase B (PelB, 21). Ce peptide signal permet un clivage naturel de la protéine de fusion exactement devant le premier résidu du peptide antigénique.

Dans une autre forme de réalisation, la
20 demanderesse envisage de remplacer le peptide signal par une protéine connue pour s'exprimer à haut niveau dans le périplasme du micro-organisme, comme la maltose binding protein (22). Le clivage entre cette protéine et le peptide antigénique s'effectue alors à l'aide d'un enzyme
25 spécifique, parmi lesquels on peut citer le facteur Xa (23) ou d'autres protéases.

Par peptide antigénique la demanderesse entend aussi une diversité de peptides antigéniques.

30 Le peptide antigénique utilisé dans l'étape (a) peut-être codé par un fragment de séquence nucléique naturelle extraite d'un organisme, d'un tissu, d'une culture cellulaire, d'une organelle, ou d'un virus. Ces fragments peuvent être obtenus à partir de l'ADN génomique ou
35 complémentaire de l'échantillon, par exemple par

fragmentation enzymatique (24). Il est alors particulièrement avantageux que certaines séquences extraites des tissus (celles codant pour une famille de protéines, par exemple) soient spécifiquement enrichies par PCR en utilisant des amorces spécifiques. De même, certaines séquences non désirées peuvent être soustraites par hybridation selon les méthodes connues en l'état de l'art (25). Dans ce cas, il est préférable de cloner les fragments obtenus à l'aide d'adaptateurs permettant d'introduire à chaque extrémité un site de clonage adapté à leur assemblage avec les autres éléments.

Dans une autre forme de réalisation, le peptide antigénique utilisé dans l'étape (a) est codé par une séquence nucléotidique de synthèse de séquence déterminée, ou dont tout ou partie de l'enchaînement de nucléotides est aléatoire. De telles séquences sont aisément obtenues à l'aide d'appareils synthétisant des oligonucléotides. Il est alors particulièrement avantageux que l'enchaînement des nucléotides aléatoires soit de séquence NNK, ce qui diminue la probabilité d'un codon Stop. De même, les séquences partiellement aléatoires ci-dessus sont caractérisées par la présence de nucléotides fixées à certaines positions, correspondant aux résidus d'ancrage des peptides antigéniques dans leur site de liaison au CMH (3). Dans ce mode, il est particulièrement avantageux d'obtenir les fragments aléatoires par PCR en utilisant une amorce tout ou partie aléatoire, ce qui permet d'introduire les sites de clonage adaptés à leur assemblage avec les autres éléments.

Il est également avantageux que les oligonucléotides codant pour le peptide antigénique contiennent de 24 à 36 nucléotides, soit 8 à 12 codons, ce qui constitue la taille optimale des peptides liant le CMH (3).

Le peptide de liaison est un peptide flexible qui relie le peptide antigénique au premier domaine du CMH de façon covalente (8, 26). Cette caractéristique est avantageuse dans la mesure où le CMH qui s'associe à un peptide adopte plus facilement une conformation fonctionnelle.

Le peptide de liaison comportera avantageusement entre 5 et 25 acides aminés choisis préférentiellement parmi la glycine, la serine, la thréonine, l'alanine et la proline. Il est également préférable que la séquence d'ADN qui la code comporte des sites de clonage adaptés à leur assemblage avec les autres éléments.

Par domaines extracellulaires du CMH, les inventeurs font référence au CMH de classe I et de classe II. Chez l'homme, les CMH-I sont codés par les loci HLA-A, HLA-B et HLA-C. Les CMH-II sont codés par les loci HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ. Les domaines extracellulaires sont les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2$) du CMH de classe I ou bien les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$ du CMH de classe II. Les séquences de ces domaines pouvant être polymorphes, tous leurs allèles naturels sont inclus dans la définition. Il en est de même pour les variants obtenus par mutagenèse dirigée, en une ou quelques positions. Ces mutations peuvent en effet être utiles à augmenter leur production ou leur sécrétion par le micro-organisme. Les domaines du CMH, ou l'ensemble des domaines appartenant à une même chaîne naturelle du CMH peuvent être obtenus par PCR en utilisant des amorces spécifiques. De même, il peut être avantageux d'obtenir en une étape différents allèles des domaines polymorphes (par exemple ceux d'un même individu) en utilisant des amorces de PCR dégénérées. A chaque domaine peut donc se substituer une diversité de domaines. La façon dont ces domaines sont ensuite combinés

entre eux dans l'étape (a) en vue de leur expression fait l'objet des différents modes suivants. Pour effectuer cette combinaison, il peut-être utile de relier les domaines les uns aux autres à l'aide de peptides flexibles (L).

5 Les quatre domaines sont présents dans la protéine de fusion de l'étape (a). Parmi les enchaînements préférés, on peut citer les enchaînements $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-L-\beta 2$ pour le CMH-I et $\alpha 1-\alpha 2-L-\beta 1-\beta 2$ ou $\beta 1-\beta 2-L-\alpha 1-\alpha 2$ pour le CMH-II, qui respectent au maximum l'enchaînement naturel des
10 domaines. On peut également citer l'enchaînements $\beta 1-L-\alpha 1-L-\beta 2-L-\alpha 2$ du CMH-II qui est structurellement analogue à l'enchaînement $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-L-\beta 2$ de classe I. De même, on peut citer l'enchaînement $\alpha 2-L-\beta 2-L-\alpha 1-L-\alpha 3$ de classe I qui se rapproche structurellement de l'enchaînement $\alpha 1-\alpha 2-L-\beta 1-\beta 2$
15 de classe II.

Dans une autre forme de réalisation, la protéine de fusion de l'étape (a) ~~inclut les deux domaines~~ liant le peptide antigénique, à savoir les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du CMH-I et $\alpha 1$ et $\beta 2$ du CMH-II. L'ajout d'un domaine $\alpha 3$ ou $\beta 2$ de
20 classe I ou $\alpha 2$ ou $\beta 2$ de classe II, ainsi que d'autres domaines de la famille des immunoglobuline (D) peut-être également utile à stabiliser la protéine. Les enchaînements du type $\alpha 1-\alpha 2-L-D$ de classe I et $\alpha 1-\beta 1-L-D$ ou $\beta 1-\alpha 1-L-D$ de classe II sont alors particulièrement avantageux.

25 Dans une dernière forme de réalisation, la protéine de fusion de l'étape (a) inclut seulement une chaîne du CMH, l'autre étant exprimée dans le périplasme du micro-organisme à l'aide d'un vecteur accessoire. Les enchaînement particulièrement intéressants sont alors les
30 enchaînement naturels $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3$ ou $\beta 2$ pour le CMH-I et $\alpha 1-\alpha 2$

ou $\beta 1-\beta 2$ pour le CMH-II ainsi que leurs analogues structuraux $\alpha 1-L-\alpha 3$ ou $\alpha 2-L-\beta 2$ pour le CMH-I. Dans ce mode, il peut être particulièrement intéressant de favoriser l'association entre les deux chaînes du CMH dans le périclasme à l'aide de domaine accessoires, par exemple des leucine zippers (7).

Le peptide flexible L est avantageusement constitué de 5 à 25 acides aminés choisi préférentiellement parmi la glycine, la serine, la thréonine, l'alanine et la proline. Il sera également particulièrement avantageux que la séquence codant pour le peptide flexible comporte des sites de clonages permettant l'assemblage des différents domaines.

La présente invention fait aussi référence à une séquence fonctionnelle. Dans un premier mode de réalisation, la séquence fonctionnelle contient avantageusement une séquence nucléotidique codant pour un peptide étiquette et un codon Stop. Ce peptide étiquette permet la mise en évidence, la purification, ou l'immobilisation de la protéine de fusion décrite en (a). Parmi les peptides étiquettes préférées, on peut citer des peptides reconnus par un anticorps particulier, par exemple le peptide c-myc-1 contre lequel est dirigé un anticorps 9E10 (Invitrogen), ou les peptides à base d'histidine qui permettent l'immobilisation et la purification de la protéine de fusion sur des matrices de complexes métal-chélate. Le codon Stop permet l'expression de la protéine de fusion soluble, et sa caractérisation. Il peut-être particulièrement pratique d'insérer un codon Stop conditionnel, du type amber (UAG), qui permet soit l'expression des séquences en aval, soit l'arrêt de la traduction protéique selon le type de micro-organisme utilisé. Parmi les micro-organismes permettant l'arrêt de l'expression, on peut citer les souches d'E. Coli

comme DH10B (Gibco). Parmi celles permettant la traduction des séquences en aval, on peut citer la souche d'E. Coli TG1.

Dans un second mode de réalisation, la séquence
5 fonctionnelle code pour une protéine qui permet la
présentation de la protéine de fusion de l'étape (a) sur la
paroi ou la membrane externe d'un micro-organisme, et plus
particulièrement d'un phage. Parmi les protéines permettant
la présentation de protéines de fusion à la surface du
10 phage, on peut citer les protéines de manteau de phage,
notamment les protéines de structure majeure et mineure que
respectivement sont les protéines g8p (27) ou g3p (14).
L'ADN codant ces protéines peut-être aisément amplifié par
PCR par l'homme du métier avec des amorces spécifiques qui
15 permettent d'introduire des sites de clonage adaptés à leur
assemblage avec les autres éléments. Lors de cette opération
il peut-être avantageux d'introduire en amont de la séquence
des protéines d'enveloppe une séquence codant pour un
peptide clivé par une enzyme protéolytique comme le facteur
20 Xa. Le clivage de la protéine de fusion présente à la
surface du phage peut être utile à obtenir à détacher les
phages spécifiquement liés à un récepteur (28, 29) ou à
purifier les complexes P-CMH.

25 Les vecteurs de l'étape (c) adaptés à la
réalisation du procédé permettent l'expression de la
séquence de l'étape (a). Ils doivent donc comporter les
régions fonctionnelles (en particulier un promoteur,
inductible ou non, et un site d'initiation de la traduction)
30 permettant l'expression de la protéine de fusion dans le
micro-organisme. De tels vecteurs sont largement disponibles
pour l'homme du métier. On peut citer par exemple les
vecteurs d'E. Coli de type plasmide comme pUC19, ou de type
phagemide comme pUC119, pAb-tag ou pAb8, ou de type phage
35 comme fd-DOG (40) ou fd-med. Le choix entre ces types de

vecteurs est dicté par l'intérêt ou non de produire des phages ou d'empaqueter l'ADN simple brin du vecteur dans un phage. Parmi ces vecteurs, on peut avantageusement utiliser des vecteurs modifiés de façon à faire exprimer à la surface
5 de phages d'autres molécules d'intérêt immunologique permettant par exemple la stimulation des cellules T (par exemple CD40L, CD80, CD86 ou d'autres ligands de CD28 ou CD40), leur délétion (par exemple, FasL ou d'autre ligands de CD95), ou des antigènes stimulant les cellules B.

10 Dans une forme préférée de réalisation du procédé, la séquence obtenue en (a) est clonée dans un vecteur du type phage, par exemple fd-med, sous la dépendance d'un promoteur du phage, qui permet à la fois l'expression dans E. Coli de la séquence obtenue en (a) et
15 la synthèse de particules de phages contenant la séquence d'ADN obtenue en (a).

Dans une autre forme préférée de réalisation, la séquence obtenue en (a) est clonée dans un vecteur du type phagemide, par exemple dans pUC119. Ceci permet l'expression
20 de cette séquence dans E. Coli. La production de particules de phages contenant la séquence obtenue en (a) est alors dépendante de la surinfection des même bactéries par un phage dit helper, comme VCSM13 (Stratagene). Ce mode offre l'avantage de pouvoir moduler la quantité de protéine de
25 fusion synthétisés.

La transfection et l'induction de l'expression du produit de la séquence nucléotidique selon les étapes (c) et (d) du procédé de l'invention, peut être obtenue par tout
30 moyen approprié (30), tel que des variations de concentration en ions ou des variations de température.

Le procédé d'expression décrit ci-dessus permet
35 de produire dans un micro-organisme, des complexes P-CMH

liés à une séquence fonctionnelle dans lesquels le peptide antigénique est lié de façon covalente au CMH. Néanmoins, l'homme de l'art sait que l'on peut obtenir des complexes P-CMH équivalents dans lequel le peptide antigénique et le CMH s'associent de façon non covalente, en vertu de l'affinité des peptides antigéniques pour le CMH (4). Cette association peut se produire dans le périplasme du micro-organisme, ou à l'extérieur. Bien que l'obtention de complexes P-CMH non covalent soit moins simple, il permet une plus grande flexibilité dans le maniement de banques de P-CMH. Il permet en particulier de combiner une banque de peptides antigéniques à une banque d'allèles du CMH (31) ainsi que d'exprimer davantage de complexe P-CMH.

En fonction des constructions de séquences nucléotidiques et des vecteurs utilisés dans le procédé de l'invention, les Inventeurs ont obtenu des complexes P-CMH non covalents.

La présente invention envisage également l'expression de complexe P-CMH non covalents liés à une séquence fonctionnelle. L'expression est obtenue selon le procédé décrit plus haut comportant les étapes suivantes modifiées :

a') la séquence nucléotidique de l'étape (a) ne contient aucun domaine du CMH, le peptide de liaison étant directement relié à la séquence fonctionnelle,

e) Les complexes P-CMH sont formés en mettant en présence le produit d'expression produit en (d) contenant le peptide antigénique et d'un ou plusieurs produits du CMH exprimés indépendamment.

Par exprimé indépendamment, on entend par exemple que les séquences codant pour le CMH et pour la séquence obtenue en (a') sont exprimées dans le même micro-organisme, mais sont portées par un autre vecteur.

L'association entre le peptide antigénique et le CMH s'effectue alors dans le périplasme du micro-organisme. Il est également possible que les séquences codant pour le CMH soient portées par le même vecteur, mais ne soient pas exprimées sous forme d'une simple chaîne avec le peptide antigénique. Il est également possible que le CMH soit produit par un autre micro-organisme, ou par tout autre procédé, l'association entre le peptide antigénique et le CMH s'effectuant alors à l'extérieur, ou à la surface du micro-organisme, et en particulier à la surface du phage.

Parmi les nombreuses formes de réalisation du procédé, certaines présentent des avantages particuliers.

Dans une réalisation particulièrement avantageuse, le CMH est produit par un autre micro-organisme. Parmi les méthodes usuelles de production des molécules de CMH, on peut citer par exemple la méthode de production dans le cytoplasme de E. Coli (5) ou la méthode de fabrication dans la levure (26) ou tout simplement des molécules de CMH naturellement présentées sur des cellules ou extraites par tout moyen appropriée. Cette dernière méthode est préférable dans la mesure où elle permet de produire des molécules de CMH vide de peptide contaminant et néanmoins stable. L'incubation entre la molécule de CMH et le peptide antigénique contenu dans le produit d'expression de l'étape (d) doit être suffisamment longue pour permettre la liaison. Dans le cas où la molécule de CMH est associée à un peptide contaminant, cette liaison est avantageusement accélérée par une température élevée, un pH légèrement acide entre 4.0 et 7.0, la présence d'agents chaotropiques, ou la dialyse du mélange qui permet de diluer spécifiquement le peptide contaminant.

La présente invention est donc aussi relative aux complexes P-CMH en eux mêmes, obtenus par les procédés décrits dans la présente description.

En fonction des constructions de séquences nucléotidiques utilisées dans le procédé de l'invention, les inventeurs ont obtenu soit des complexes P-CMH solubles, soit des complexes P-CMH présentés à la surface de micro-organismes.

La présente invention concerne donc aussi un procédé de production d'un complexe P-CMH soluble, caractérisé en ce que l'on exprime un complexe P-CMH par le procédé d'expression précédent, dans lesquels la séquence fonctionnelle utilisée à l'étape (a) ou (a') code pour un peptide étiquette et un codon Stop, et en ce que le complexe P-CMH est récupéré, après l'étape (d) ou (e), par tout moyen approprié connu de l'homme du métier à l'aide, notamment, dudit peptide étiquette.

Un tel procédé présente l'avantage de permettre la production d'un complexe P-CMH soluble directement fonctionnel et facilement purifiable. Ce procédé est donc peu coûteux et facile à mettre en oeuvre en comparaison aux procédés de production de complexe P-CMH de l'art antérieur. Il est notamment utile à produire de nombreux complexes P-CMH solubles.

L'invention a aussi pour objet un complexe P-CMH soluble obtenu par le procédé ci-dessus. Les complexes P-CMH solubles de l'invention peuvent notamment être utilisés dans un procédé de marquage et de tri de cellules T spécifiques d'un ou plusieurs complexes P-CMH.

Un procédé de marquage et de tri des cellules T selon l'invention comprend les étapes suivantes :

i) on met en présence :

- un excès d'un complexe P-CMH soluble porteur d'un peptide étiquette, obtenu par le procédé de l'invention et,

- un "pool" de récepteurs de cellules T. Par pool de récepteurs de cellules T, on entend un ensemble de différents récepteurs, présentés sous forme soluble ou à la surface de cellules T, dont la spécificité antigénique est
5 inconnue,

ii) on sélectionne les complexes P-CMH liés spécifiquement aux récepteurs de cellules T de l'étape (i) en éliminant par tout moyen approprié, tel qu'un lavage, l'excès de P-CMH soluble n'étant pas lié de manière
10 spécifique,

iii) on marque les complexes P-CMH liés aux récepteurs de cellules T sélectionnés à l'étape (ii) à l'aide d'une sonde spécifique du complexe P-CMH, comme par exemple le peptide étiquette de ce dernier,
15

iv) on repère par tout moyen approprié les récepteurs de cellules T marqués à l'étape (iii). On peut également trier ces cellules par toute méthode adaptée, en utilisant par exemple les appareils trieurs de cellules (FACS).
20

Les complexes P-CMH solubles de l'invention peuvent de plus être utilisés pour moduler de manière spécifique l'activité de cellules T, plus particulièrement sous forme immobilisée. Par forme immobilisée on entend
25 immobilisée sur tout type de support ou matrice connu de l'homme du métier, et tout particulièrement des polymères recouverts de molécules comme les anticorps ou les complexes métal-chélate.

30 L'invention se rapporte donc également à l'utilisation d'un complexe P-CMH soluble pour la préparation d'une composition diagnostique et/ou vaccinale utile pour moduler de manière spécifique l'activité de cellules T.

Les Inventeurs ont mis en évidence dans le cadre des travaux ayant mené à la présente invention, qu'il est possible de présenter des complexes P-CMH de taille importante à la surface de micro-organismes.

5 L'invention a donc encore pour objet un procédé de préparation d'un micro-organisme présentant à sa surface un complexe P-CMH, consistant à exprimer un complexe P-CMH par un procédé d'expression selon la présente invention dans lequel la séquence fonctionnelle utilisé à l'étape (a) ou
10 (a') code pour une protéine permettant la présentation du complexe P-CMH à la surface dudit micro-organisme. De manière préférée, les protéines envisagées sont la g8p et/ou la g3p. La demanderesse envisage aussi la récupération du complexe P-CMH après l'étape (d) ou (e) par tout moyen connu
15 de l'homme du métier.

L'invention a donc également pour objet un micro-organisme, plus particulièrement un phage, présentant à sa surface le complexe P-CMH obtenu par les procédés ci-dessus.

20

De tels micro-organismes peuvent notamment être utilisés dans un procédé de marquage et de tri de cellules T spécifique d'un ou plusieurs complexes P-CMH.

25 Un tel procédé comporte les étapes suivantes:

i') on met en présence :

- un excès de micro-organisme, notamment de phage, présentant un complexe P-CMH, obtenu par le procédé de l'invention et,

- un "pool" de récepteurs de cellules T,

30 ii') on sélectionne les récepteurs de cellules T liés spécifiquement avec les phages portant le complexes P-CMH de l'étape (i') en éliminant par tout moyen approprié l'excès de phage n'étant pas lié de manière spécifique,

~~iii') on marque les récepteurs de cellules T~~
35 liés aux phage sélectionnés à l'étape (ii') à l'aide d'une

sonde spécifique du phage telle qu'un anticorps dirigé contre le phage,

iv') on récupère par tout moyen approprié les récepteurs de cellules T marqués à l'étape (iii'). On peut
5 également trier ces cellules par tout moyen approprié

De tels micro-organismes, et particulièrement les phages, peuvent également être utilisés pour moduler de manière spécifique l'activité de cellules T,
10 préférentiellement sous forme immobilisée.

Il est particulièrement en effet aisé d'immobiliser des phages, par exemple sur du polystyrène auquel ils adhèrent spontanément, ou par l'intermédiaire d'anticorps anti-phage immobilisés, ou encore en utilisant
15 des vecteurs de phages modifiés exprimant par exemple des peptides qui favorise leur adhésion à des cellules (32) ou à des matériaux (33).

L'invention se rapporte donc également à l'utilisation de micro-organisme, et plus particulièrement
20 de phages, présentant un complexe P-CMH à leur surface pour la préparation d'une composition diagnostique et/ou vaccinale utile pour moduler de manière spécifique l'activité de cellules T.

25 D'une manière originale, le deuxième mode de réalisation du procédé est particulièrement apte à être utilisé pour la constitution de banques de micro-organismes exprimant à leur surface un complexe P-CMH.

Par banques de micro-organisme, on entend une
30 diversité de micro-organismes obtenus par le procédé de l'invention en utilisant dans l'étape (a) ou (a') une séquence codant pour une diversité de peptides antigéniques.

Ces banques de micro-organismes, et
préférentiellement de phages, sont utiles pour le criblage

des peptides antigéniques à l'aide un récepteur de cellules T, présenté sous forme soluble ou à la surface de cellules.

La présente invention porte donc aussi sur
5 l'utilisation de banques de micro-organismes décrites ci-dessus pour le criblage de peptides antigéniques reconnus par un récepteur de cellule T donné.

Un procédé de criblage selon la présente
10 invention est caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

i") on met en présence une banque de complexes P-CMH selon la présente invention et un récepteur de cellules T défini, sous forme soluble ou disposé à la
15 surface de cellules,

ii") on sélectionne les phages présentant le complexe P-CMH liés de manière spécifique avec le récepteur T de l'étape (i") en éliminant les phages qui ne sont pas liés de manière spécifique par tout moyen approprié, tel
20 qu'un lavage,

iii") on récupère par tout moyen approprié dans les phages sélectionnés à l'étape (ii") la séquence nucléotidique codant pour le peptide antigénique.

Il est aisé pour l'homme du métier de récupérer
25 la séquence nucléotidique d'un peptide provenant d'une banque de peptides. Il lui suffit, par exemple, à partir de la construction utilisée en (a) ou (a') d'obtenir la séquence nucléotidique incluse dans ladite construction et
30 codant pour le peptide antigénique.

Un autre objet de la présente invention est un peptide sélectionné par le procédé de criblage objet de l'invention. En effet, les peptides sélectionnés sont

reconnus par les récepteurs de cellules T et en conséquence sont dotés de propriétés immunologiques.

5 Un objet supplémentaire de la présente invention consiste donc en l'utilisation d'un peptide sélectionné par une méthode de criblage selon l'invention pour la préparation d'une composition diagnostique et/ou pharmaceutique destinée à moduler l'activité des cellules T.

10

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront dans la description détaillée qui suit et qui se réfère aux dessins en annexes dans lesquels :

15

- La Figure 1 représente différents exemples d'assemblage de séquences permettant d'exprimer des complexes P-CMH. Dans les figures et les exemples qui suivent, K^d est le domaine d'un produit du CMH (H-2K^d murin) sur lequel les travaux des Inventeurs ont été effectués.

20

A : L'ADN codant pour le peptide antigénique, le peptide de liaison, les domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de K^d et la $\beta 2$ -microglobuline murine ont été assemblés par PCR.

25

B : Les complexes P-CMH covalents ont été exprimés sous la forme d'une fusion avec le peptide signal de la protéine pectine lyase B (PelB) et avec des séquences fonctionnelles différentes selon le vecteur de clonage utilisé. Dans le vecteur de type phage fd-med, la séquence fonctionnelle code pour la protéine de surface mineure du phage (g3p) ; dans le vecteur de type phagemide pAb-tag, la séquence fonctionnelle code pour un peptide étiquette c-myc-1-(tag) et un codon stop(*) ; dans le vecteur du type phagemide pAb8, la séquence fonctionnelle code pour la

30

protéine majeure de surface du phage (g8p). Dans ce vecteur, différents arrangements des domaines du CMH ont été exprimés.

5 C : La séquence codant pour le peptide antigénique a été également cloné en fusion avec les séquences codant pour le peptide signal PelB, le peptide de liaison, et avec différentes séquences fonctionnelles. Les complexes P-CMH non covalents ont été réalisée par incubation avec des molécules de K^d produites indépendamment.

10 RBS : site d'interaction du Ribosome ; LacZ : séquence du promoteur inductible du gène Lac ; g3p L: peptide signal naturel de la protéine g3p de fd qui, dans le génome de fd-med est interrompu par la présence de 2 codons Stop (*). La protéine mature attendue est indiquée en
15 caractère gras.

- La figure 2 représente la caractérisation de protéines de fusion P-MHC dans l'espace périplasmique.

En A : sandwich ELISA montrant la présence de molécules P-K^d solubles dans l'espace périplasmique de *E. Coli* transformées avec les vecteurs décrits dans la figure
20 1. Des extraits périplasmiques (abscisse) ou les dilutions contrôles de molécules de K^d produites par un autre procédé (ronds pleins) sont incubés dans des puits de plastique recouverts par l'anticorps monoclonal 20.8.4S (dirigé contre
25 les domaines $\alpha 1/\alpha 2$ de K^d) et révélés à l'aide d'un anticorps biotiné SF-1.1.1 (dirigé contre le domaine $\alpha 3$ de K^d), cet anticorps étant lui-même révélé par un anticorps anti-biotine conjugué à la peroxydase.

En B : analyse par Western blot des protéines
30 périplasmiques révélées avec un anticorps anti-c-myc-1 conjugué à la peroxydase. scAb : anticorps simple chaîne contrôle OKT3.

En C : stimulation de cellules T spécifiques du peptide HA et restreintes à K^d à l'aide de molécules solubles

P-K^d (2 ng / ml) immobilisées sur le plastique en utilisant de l'avidine et un anticorps biotiné SF-1.1.1. PMA-Iono: 10 ng/ml phorbol 12- myristate 13- acétate, 150 ng/ml ionomycine ; anti-TCR : anticorps anti-TCR biotinés (1 µg/ml) résultats exprimés sous la forme de la valeur moyenne de 3 valeurs avec déviation standard.

- La figure 3 représente l'expression de complexes P-CMH à la surface de phages.

ELISA montrant l'interaction de différentes dilutions (abscisse) de phages K^d-fd exprimant le peptide HA (ronds pleins), Cw3 (triangle pleins) ou PbCS (carres pleins) ou bien l'interaction du phage sauvage fd (triangles vides) avec des puits en plastique recouverts avec l'anticorps anti-K^d 20.8.4.S (dirigé contre les domaines α1 et α2, cadre supérieur) ou bien avec l'anticorps SF-1.1.1 (dirigé contre le domaine α3, cadre inférieur). En insert: inhibition de l'interaction de fd et de K^d-fd (abscisse) en présence (barre creuse) d'un excès d'anticorps solubles 20.8.4S (moyenne ± déviation standard, n=3).

- La figure 4 représente la caractérisation biochimique de complexes P-MHC exprimés à la surface de phages.

En A : ELISA montrant l'interaction de plusieurs dilutions (abscisse) de phages K^d-fd exprimant les peptides HA (carres), Cw3 (ronds) ou PbCS (triangles) avec les anticorps immobilisés sur le plastique 20.8.4S (anti-K^d symbole plein) ou avec l'anticorps 57D1 (anti-g3p N-terminal, symbole vide) comme contrôle les phages Cw3-K^d-fd ont été immunopurifiés sur un anticorps anti-K^d SF-1.1.1 avant la réalisation du test (losanges).

En B : analyse par SDS-PAGE 12% des protéines du phage sauvage fd, du phage exprimant l'anticorps simple chaîne contrôle OKT3 (scAb-fd) et les phages HA-K^d-fd

(environ 3.10^9 c.f.u.). Les Westerns blots ont été révélés avec un anticorps g3p suivit d'un anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase et chimiluminescence. Dans l'échantillon de phage immunopurifié (IP) la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal SF-1.1.1 est visible sous la forme d'une large bande de masse moléculaire de 50 Kd.

- La figure 5 illustre la spécificité de l'interaction de complexes P-MHC présentés à la surface de phages un TCR.

10 En A: interaction (ELISA) du phage sauvage fd (barre doublement hachurée) ou bien du phage P-K^d-fd exprimant le peptide Cw3 (barre pleine), le peptide HA (barre hachurée) ou le peptide PbCs (barre vide) avec le TCR recombinaut simple chaîne Cw3-1.1 (3 µg/ml, spécifique de Cw3, restreint à K^d, moyenne plus ou moins déviation standard, n=9), le TCR soluble Kb5-C20 (3 µg/ml TCR alloréactif anti-K^b, n=3), ou bien des protéines du lait (n=6). ** : L'interaction des phages Cw3-K^d-fd avec le TCR Cw3-1.1 est significativement plus importante ($p < 0.001$) que celle du phage HA-K^d-fd, et également plus importante que celle du phage Cw3-K^d-fd au TCR Kb5-C20.

25 En B : Analyse comparative de l'interaction (ELISA) des différentes dilutions (abscisse) de Cw3-K^d-fd phage avec l'anticorps monoclonal 20.8.4.S immobilisé sur du plastique (1 µg / ml, anticorps anti-K^d domaine $\alpha 1$ / $\alpha 2$, rond), le TCR Cw3-1.1 (1 µg/ml, carre) ou le TCR Kb5-C20 (1 µg / ml, triangles).

30 En C : Analyse comparative de l'interaction (ELISA) de phage P-K^d-fd exprimant le peptide Cw3 (symboles pleins) ou bien le peptide HA (symboles vides) avec le TCR Cw3-1.1 immobilisé sur du plastique (à la concentration de

10 μg / ml, carrés). Les titres de phages Cw3-K^d-fd (abscisse) ont été corrigés ($\times 2.1$) pour permettre de comparer à égalité sa réactivité envers l'anticorps anti-K^d 20.8.4S (1 μg / ml) avec celle du phage HA-K^d-fd (insert, 5 ronds).

En D : Récupération de phage P-K^d-fd exprimant le peptide Cw3 (barres pleines), ou bien le peptide HA (barres hachurées), ou bien le peptide PbCS (barres vides) après une seule étape de sélection contre le TCR Cw3-1.1. 10 immobilisé sur le plastique (à la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ou bien après sélection contre le TCR Kb5-C20 (immobilisé à la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ou bien après sélection contre des protéines du lait immobilisées (abscisse).

15 - La figure 6 représente la caractérisation de complexes P-CMH non covalents présentés à la surface de phages.

En A: interaction (ELISA) des phages K^d-HA-M13 (carrés) et K^d-HA-fd (ronds), exprimant le complexe non 20 covalent HA-K^d, avec l'anticorps anti-K^d 20.8.4S (symboles pleins, immobilisé à la concentration de 1 μg / ml, moyenne plus ou moins déviation standard, $n=3$) ou bien avec des protéines du lait (symbole vide).

En B: interaction (ELISA) des phages A2-HA-M13 (losanges) et A2-POL-M13 (triangle) exprimant le complexe 25 non covalent POL-A2 avec l'anticorps anti-HLA-A2 B9.12.1 (symboles pleins, immobilisé à la concentration de 1 μg / ml, moyenne plus ou moins déviation standard, $n=3$) ou bien des protéines du lait (symboles vides).

30 En C : Marquage (FACS) des cellules 2D4 exprimant le TCR spécifique du peptide HA et restreint à K^d à l'aide de phages Kd-HA-M13 exprimant le complexe HA-Kd lié à

la g8p (histogramme plein). Les cellules ont été incubées à 4°C avec les phages, lavées, incubées avec un anticorps anti-phage biotiné, lui-même révélé par de la streptavidine marquée à la phycoérythrine. Le nombre de cellules (ordonnée) émettant la fluorescence spécifique (abscisse) est indiqué. En vide, marquage de cellules contrôles n'exprimant pas le TCR, et marquage des deux types de cellules en présence d'une inhibition par 10 µg d'anticorps anti-K^d 20.8.4S.

10

I - Matériel et méthodes.

1) Constructions

Les PCR ont été réalisées dans un thermocycleur PTC100 (MJ Research) et les cycles ont été les suivants : 30 cycles (95°C 40 s, 55°C 1 min., 72°C 2 mn), 0.5 µM d'oligonucléotides, 250 mM de dNTP, 1.5 mM de MgCl₂ et 20 U/ml d'ADN polymérase Taq. Les produits de PCR ont été digérés par des enzymes de restriction obtenus chez New England Biolabs, puis purifiés par Wizard Prep PCR (Promega). Les séquences d'ADN ont été vérifiées sur les deux brins en utilisant des kits de séquences et un séquenceur automatique ABI 377 de chez Perkin-Elmer. La reverse transcriptase dérivée de l'AMV a été obtenue de Boehringer Mannheim (TITANTM 1 tube RT-PCR kit).

20

30

2) Expression des phages

Les titres de bactériophages ont été mesurés sous la forme d'unités formant colonies (c.f.u.) en comptant le nombre de colonies d'*E. Coli* résistantes à l'antibiotique approprié, obtenues après infection de la souche bactérienne

TG1 avec plusieurs dilutions différentes de suspension de phages.

3) Western Blot

5 Les protéines solubles et les protéines du phage ont été soumises à une analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de 12% de SDS (12% SDS-PAGE, Gels Novex, San Diego, Californie) dans des conditions réductrices, le contenu des gels a été ensuite transféré par
10 électroblot sur des membranes de nitrocellulose (Hybond C extra, Amersham), les membranes ont été ensuite bloquées par l'addition d'une solution de lait écrémé dans du tampon phosphate salin (PBS) et analysées avec un anticorps monoclonal 9E10 dirigé contre l'épitope c-myc-1 (Invitrogen, dilution 1/1000 dans une solution de PBS, 1 g / 1 Tween-20, PBS-Tween) ou bien l'anticorps anti-g3p spécifiquement dirigé contre le troisième domaine de la g3p qui est
15 nécessaire à l'incorporation de cette protéine dans la particule virale (Eurogentec, dilution 1/1000 dans une solution de PBS-Tween). Après incubation avec les anticorps les membranes ont été révélées par l'addition d'un anticorps anti-souris marqué à la peroxydase (dilution 1/1000, Sigma), ses anticorps ont été détectés par chimiluminescence (kit ECL, Amersham).

25

4) ELISA

Pour les test ELISA, des plaques à micro-puits en polystyrène (Nunc) ont été recouvertes par incubation pendant toute une nuit d'une solution de PBS contenant
30 différents anticorps, à 4°C. Les anticorps utilisés sont l'anticorps 20.8.4S dirigé contre les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule K^d (clone ATCC HB-11), l'anticorps monoclonal SF-1.1.1 dirigé contre le troisième domaine $\alpha 3$ de la molécule K^d (clone ATCC HB-159, de chez Pharmigen),

l'anticorps monoclonal B-9.12.1 (de chez Immunotech), dirigé contre les molécules HLA de classe I, l'anticorps monoclonal 57D1 dirigé contre la protéine g3p du phage M13 (un don du Docteur Monaci, IRBM, Rome, Italie), et un anticorps de lapin anti-phage-fd (Sigma). Des molécules recombinantes solubles de TCR simple chaîne ont été également immobilisées à la surface de plaques ELISA. Ces TCR solubles Cw3-1.1 et Kb5-C20 ont été produits et fournis par le Docteur C. Grégoire du Centre d'Immunologie à Marseille, en France (34). Après saturation en présence d'une solution de lait écrémé dans du PBS (40 g de lait Régilait écrémé pour 1 l de PBS) pendant 2 heures à 25°C, les phages ou les extraits péripasmiques dilués dans du PBS-lait ont été ajoutés aux plaques pendant 2 heures, puis lavés trois fois à l'aide PBS-Tween, puis lavés deux fois à l'aide de PBS. Les phages restant attachés aux protéines immobilisées sur le polystyrène ont ensuite été révélés avec un anticorps anti-M13 marqué à la peroxydase (Sigma, dilution 1/3000 dans du PBS-lait pendant 1 heure). Les molécules K^d solubles restant attachées aux plaques de polystyrène ont elles été révélées avec un anticorps biotiné SF-1.1.1 (Pharmingen, 1 µg/ml dans du PBS-lait) suivi par l'incubation avec un anticorps anti-biotine marqué à la peroxydase (Sigma 1/5000 dans du PBS-lait). Après trois lavages en PBS-Tween, l'activité peroxydase a été détectée par ajout du substrat TMB (Pierce).

30

5) Test de prolifération des cellules T

Pour les test de prolifération cellulaires, les cellules CD8 purifiées ont été isolées à partir de la rate et des ganglions lymphatiques de souris transgéniques pour le TCR spécifique du peptide HA et restreint à la molécule

kd (35). Les cellules ont été purifiées grâce à l'utilisation de l'anticorps de rat 53-6.7 dirigé contre la molécule CD8 murine (Pharmingen) par sélection positive à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-rat (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Allemagne). Par analyse cytofluorométrique, il fut déterminé que 90% des cellules ainsi sélectionnées étaient de phénotype CD8+ BV8+. La prolifération cellulaire des cellules purifiées (10⁵ cellules purifiées dans un puits de culture) a été mesurée après 48 heures de culture cellulaire en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée pendant une période de 12 heures.

II - Résultats

15

1. Construction de séquences codant pour des enchaînements de domaines du CMH

Cette méthode permet d'obtenir l'ADN codant pour différents enchaînements d'un ou plusieurs domaines du CMH. Dans cet exemple, les Inventeurs se sont intéressés à l'allèle du CMH murin H-2K^d. L'ADN codant successivement pour l'enchaînement $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ -L15- $\beta 2m$ de K^d et la $\beta 2$ -microglobuline murine, ou L15 est un peptide de liaison de 15 aminoacides (Fig. 1A), ont été donnés par Jean-Pierre Abastado (Institut Pasteur, Paris, France, Mottez et al. 1995). Cet ADN a été amplifié par PCR en utilisant les oligonucléotides suivants : 5'-GGT GGC CCG GGG GGT GGT TCT GGG GGT GGG GGC CCA CAT TCG CTG AG et 5'-AAC AGT TTC TGC GGC CGC CAT GTC TCG ATC CCA GTA GAC G qui permettent d'ajouter des sites de clonages XmaI et NotI. L'ADN codant pour le CMH a été initialement cloné dans le plasmide pBluescript KS+.

Pour obtenir un enchaînement $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -L18- $\beta 2m$, ou L18 est un linker de 18 aminoacides, la construction précédente a été digérée avec BamHI et BglII et les

extrémités ont été réassociées. Alternativement, pour obtenir un enchaînement $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3$, la même construction a été digérée avec *AccI* et *BamHI*, les extrémités ont été traitées par le fragment de Klenow de la polymérase en présence de dNTP, puis réassociées. Pour obtenir un enchaînement $\alpha 1-\alpha 2$, cette dernière construction a été digérée avec *BamHI* et *BglIII* et les extrémités ont été réassociées.

Une construction de contrôle codant pour un anticorps simple chaîne (scAb) a été obtenue par clonage du fragment variable simple chaîne de l'anticorps monoclonal OKT3 (36) en utilisant une procédure d'assemblage par PCR similaire.

2. Construction de séquences codant pour des peptides antigéniques

Cette méthode permet d'obtenir les séquences d'ADN codant pour différents peptides antigéniques. Dans cet exemple, les Inventeurs se sont intéressés au peptide antigénique HA de séquence IYSTVASSL, correspondant aux résidus [515-523] de l'hémagglutinine du virus de la grippe (37) ou bien Cw3 de séquence RYLKNGKETL, correspondant au résidu [170-179] de la molécule HLA-Cw3 (38), ou bien PbCs de séquence SYIPSAEKI correspondant au résidu [252-260] de la protéine *Circumsporozoite* de *Plasmodium Berghei* (39). L'ADN double brin codant pour les peptides antigéniques (Fig. 1A) a été construit par PCR en utilisant un oligonucléotide anti-sens 5'-ACC CCC CGG GCC et un oligonucléotide sens présentant la séquence générique suivante : 5'-GCC CAG CCG GCC ATG GCC-X-GGT GGC CCG GGG GGT GGT TCT GGG-3' ou X code pour le peptide antigénique. X signifie ATC TAC TCT ACT GTT GCT TCT TCA TTA pour le peptide HA, ou bien CGT TAT TTG AAA AAC GGT AAA GAA ACT TTG pour le peptide Cw3, ou bien TCT TAC ATC CCA AGC GCA GAA AAA ATA pour le peptide PbCS.

3. Assemblage des séquences.

Cette méthode permet l'assemblage des séquences d'ADN codant pour un peptide signal, un peptide antigénique, un peptide de liaison, un ou des domaines du CMH, et différentes séquences fonctionnelles.

Dans cet exemple, les Inventeurs se sont intéressés au peptide signal PelB qui permet le clivage de la protéine exprimée exactement avant le premier résidu N-terminal du peptide antigénique (Fig. 1A) et à un peptide de liaison de 15 aminoacides (Fig. 1A).

L'assemblage des séquences codant pour les protéines de fusion entre le peptide signal PelB, le peptide de liaison, le peptide antigénique, les domaines du CMH et la protéine g3p, à été réalisé par clonage entre les sites SfiI et NotI dans le vecteur phage fd-med, dérivé de fd-DOG (40), qui porte le gène de résistance à la tétracycline et a été fourni par le Docteur I. Fisch de l'école Polytechnique Fédérale à Lausanne en Suisse. Le vecteur fd-med présente les avantages d'introduire un codon stop dans le gène codant pour g3p, en l'absence d'ADN complémentaire inséré. De cette manière, les cellules transformées avec fd-med ne produisent que de très faible titres de phages (moins de 10^6 c.f.u. par litre de culture). Les vecteurs obtenus, P-CMH-fd, permettent l'expression de phages présentant des complexes P-CMH covalents liés à la g3p. Il ont été électroporés dans des bactéries de souche DH10B fournies par la compagnie Gibco.

L'assemblage des séquences codant pour les protéines de fusion avec la protéine g8p du phage au lieu de la g3p a été réalisé par clonage entre les sites SfiI et NotI du vecteur pAb8, qui porte le gène de résistance à l'ampicilline. Ce vecteur a été obtenu en amplifiant la séquence codant la g8p du phage par PCR en utilisant le phage fd comme matrice et les amorces sens 5'-GAT TCT AGA

GGT TCG GCC GCA GCT GAG GGT GAC GAT CCC GCA et anti-sens 5'-
 AGT GAA TTC TTA TTA GCT TGC TTT CGA GGT GAA TTT, puis en
 clonant le fragment obtenu à la place du fragment NotI-EcoRI
 de pAb-tag. Les vecteurs finalement obtenu, P-CMH-pAb8,
 5 permettent l'expression, à l'aide de phage helper, de phages
 présentant des complexe P-CMH covalents liés à la g8p. Il
 ont été électroporés dans des bactéries de souche TG1.

L'assemblage des séquences codant pour les
 protéines de fusion entre le peptide signal PelB, le peptide
 10 de liaison, le peptide antigénique, les domaines du CMH et
 un peptide étiquette, a été réalisé par clonage entre les
 sites SfiI et NotI du vecteur pAb-tag, un dérivé du vecteur
 pUC119 (40) qui porte le gène de résistance à l'ampicilline,
 et qui été fourni par le Docteur G. Winter, MRC, Cambridge,
 15 Grande-Bretagne. Les vecteurs obtenus, P-CMH-pAb-tag
 permettent l'expression des protéines P-CMH solubles après
 induction du promoteur LacZ. Ils ont été électroporés dans
 des bactéries de souche DH10B fournies par la compagnie
 Gibco.

20

4. Assemblage de séquences permettant la production de complexes P-CMH non covalents.

Cette méthode permet de transformer les
 séquences d'ADN obtenues dans l'exemple 3 en vue de la
 25 production de complexes P-CMH non covalents. Dans cet
 exemple, les Inventeurs se sont intéressés à transformer le
 vecteur HA-K^d-pAb-tag en reliant directement le peptide de
 liaison au site NotI du vecteur pAb-tag (Fig. 1C). Un
 fragment de PCR a été obtenu en utilisant le vecteur pAb-tag
 30 comme matrice et les oligonucléotide sens 5'-CAG GAA ACA GCT
 ATG ACC A et anti-sens 5'-AGC TGC GGC CGC CCC ACC CCC AGA
 ACC. Ce fragment a été inséré dans le vecteur HA-K^d-pAb-tag
 entre les sites SphI et NotI pour obtenir le vecteur HA-pAb-
 tag, qui permet d'exprimer une fusion entre le peptide
 35 antigénique, un peptide de liaison de 15 aminoacides, et un

peptide étiquette sous forme soluble. La même transformation a été appliquée à différents vecteurs P-CMH-pAb8 et P-CMH-fd.

5 5. Construction de séquences codant pour une diversité aléatoire de peptides antigéniques

Cette méthode permet d'exprimer la totalité des variants désiré d'un peptide antigénique. Dans cet exemple, les Inventeurs ont cloné dans un premier cas les variants du peptide antigénique HA aux positions 4 et 6 (de séquence IYSTxVxSSL ou x représente n'importe quel aminoacide), et dans un second cas tous les variants conservant les résidus d'ancrage à la molécule K^a (de séquence xYxxxxxxxxL). L'ADN codant pour ces diversités de peptides antigéniques a été construit par PCR en utilisant comme matrice le vecteur pAb-tag, un oligonucléotide sens 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC A et un oligonuléotide anti-sens présentant la séquence générique suivante : 5'- ACC CCC CGG GCC ACC X GGC CAT GGC CGG CTG GGC CGC, ou X code pour une diversité de peptides antigéniques.

20 X signifie TAA TGA AGA MNN AAC MNN AGA GTA GAT dans le premier cas, et TAA MNN MNN MNN MNN MNN MNN GTA MNN dans le second cas. Les fragments obtenus ont été digérés avec SphI et XmaI et clonés aux mêmes sites dans les vecteurs décrits Figure 1B. Le séquençage de 36 fragments obtenus a montré la diversité attendue aux positions variables. Cette méthode a également été utilisée pour cloner le peptide antigénique POL, dérivé du gène *pol* du virus VIH, de séquence ILKEPVHGV à l'aide d'un oligonucléotide ou X signifie CAC GCC GTG CAC TGG CTC TTT AAG GAT.

30

6. Construction de séquences codant pour une diversité de peptides antigéniques dérivés d'un tissu

Cette méthode permet d'exprimer la totalité des différents peptidiques d'une longueur comprise entre 8 et 12 aminoacides pouvant dériver d'une protéine particulière.

35

Dans cet exemple, les peptides sont issus des variants de la protéase du virus VIH-1 isolés du sang d'un patient.

L'ARN total a été extrait à partir de 1 ml de sang de patient contenant des cellules infectées selon Sambrook (30). L'ADNc correspondant aux transcrits de la protéase de VIH a été amplifié par reverse transcription suivie d'une PCR (RT-PCR) en une seule étape, à l'aide des amorces 5'-AGA GCT TCA GGT TTG GGG et 5'-AAG CCA GGA ATG GAT GGC. Les séquences spécifiques ont été à nouveau amplifiées par PCR avec les amorces 5'-GAA GCA GGA GCC GAT AGA CA et 5'-CCT ATT GAA ACT GTA CCA GT. 100 µg du produit de PCR ont été fragmentés par digestion contrôlée à la DNase-I (30). Les fragments mesurant environ 30 paires de bases ont été purifiés par gel d'agarose, purifiés, traités par la T4 DNA polymérase et le fragment Klenow de la DNA polymérase I, associés à un adaptateur à bouts francs spécifiquement conçu permettant de les cloner dans le site NaeI du vecteur pAb-tag. Le séquençage de 36 fragments obtenus a montré que 30 fragments avaient 24 à 36 paires de base et codaient pour la protéase du VIH.

7. Expression de complexes P-CMH covalents solubles et fonctionnels dans le périplasme.

Cette méthode permet d'exprimer des complexes P-CMH covalents dans le périplasme d' *E. Coli* et de vérifier qu'ils sont repliés de manière appropriée. Dans cet exemple, les Inventeurs ont exprimé des complexes P- K^d muni du peptide étiquette c-myc-1 et les ont caractérisés.

Les clones bactériens transfectés avec un vecteur P-CMH-pAb-tag ont été cultivés pour multiplication à 37°C dans un milieu 2YT comprenant 100 µg/l d'ampicilline, 10 g/l de glucose jusqu'à ce que la densité optique de la culture atteigne 0.6 par mesure de densité optique à 600 nm. L'expression protéique a ensuite été induite dans les

bactéries par l'addition d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (1 mM) pendant une durée de 4 heures à la température de 30°C. Les bactéries ont été ensuite centrifugées et les culots bactériens ont été incubés pendant 45 min. à 4°C dans une
5 solution comprenant 2 mM de Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M sucrose, 0.5 mM EDTA. Après centrifugation (10 000 g pendant 20 min.) les extraits périsplasmiques ont été filtrés (0.22 μ m) et stockés à -20°C.

Les résultats montrent (Fig. 2) que des
10 molécules recombinantes HA-K^d et Cw3-K^d sont produites et peuvent être extraites du périplasme de E. Coli après induction. D'une manière intéressante, les protéines de fusion interagissent spécifiquement avec les anticorps monoclonaux 20.8.4S et SF-1.1.1 qui reconnaissent des
15 épitopes conformationnels présents sur les domaines α 1/ α 2 et les domaines α 3 de K^d, respectivement (Fig. 2A). Les protéines HA-K^d et Cw3-K^d ont été ensuite quantifiées par une méthode ELISA en sandwich (environ 500 et 30 ng/l de culture bactérienne, respectivement Fig. 2A). Finalement,
20 des molécules HA-K^d peuvent être détectées par Western Blot à la taille attendue (50 kDa, Fig. 2B).

Les résultats montrent également (Fig. 2C) que la conformation adoptée par le complexe P-K^d covalent sécrété dans le périplasme est capable d'entraîner la
25 stimulation spécifique de cellules T comme cela a été décrit précédemment à partir de complexes P-K^d covalents produits dans des systèmes eucaryotes (26).

Les extraits de protéines périsplasmiques contenant des molécules P-K^d solubles ont été immobilisées
30 sur du plastique grâce à l'anticorps monoclonal SF-1.1.1 lui-même immobilisé (1 μ g / ml en PBS). Cet anticorps ne gêne pas l'interaction entre P-K^d et le TCR (41). Comme il est

montré dans la Figure 2C, les complexes HA-K^d immobilisés sont capables de stimuler de manière spécifique du peptide HA des cellules T restreintes par la molécule K^d, alors que des quantités similaires de complexes Cw3-K^d immobilisés, ou bien d'un anticorps simple chaîne contrôle, n'ont aucun effet sur ces cellules mêmes T. L'activation des cellules T est inhibée d'une manière spécifique par un excès (10 µg/ml) d'anticorps monoclonal 20.8.4S.

10 8. Expression de complexes P-CMH à la surface de phages - première méthode.

Cette méthode permet d'exprimer des complexes P-CMH à la surface de phages. Dans cet exemple, les Inventeurs se sont intéressés à exprimer les complexes P-K^d covalents
15 liés à la protéine g3p grâce à un vecteur de type phage (Fig. 1A, fd-med) et à caractériser les complexes obtenus.

Les clones bactériens transfectés avec un vecteur P-K^d-fd ont été multipliés par culture à 37°C en milieu 2YT comprenant 15 µg/ml de tétracycline, 10 g/l de
20 glucose jusqu'à ce que la culture atteigne une densité optique de 0.9 à 600 nm, pour être ensuite maintenue en culture pendant 16 heures à 30°C. Les particules de phages ont été précipitées à partir du surnageant de culture en ajoutant à ce dernier un volume de polyéthylène glycol 8000
25 (Sigma, 200 mg/ml dans 2.5 M NaCl) pour 4 volumes de surnageant de culture. Le précipité a été remis en suspension dans une solution de PBS comportant 3 g/l de BSA, et filtré (0.45 µm) et stocké sous forme d'aliquot à -20°C.

Quand un mini-gène P-K^d est introduit dans le
30 génome de fd-med (Fig. 1A) des titres très élevés de phages sont sécrétés dans le surnageant (de 0.1 à 5 10¹³ c.f.u. par litre de culture, dans différentes conditions de culture). Des titres comparables de phages HA-K^d-fd, de phages PbCs-

K^d-fd et de phages exprimant l'anticorps simple chaîne contrôle, ont été obtenus.

La figure 3 montre que les phages P-K^d-fd interagissent de manière spécifique avec les anticorps monoclonaux 20.8.4S et SF-1.1.1 qui reconnaissent des épitopes conformationnels présents sur les domaines $\alpha 1/\alpha 2$ et $\alpha 3$ de K^d, respectivement. Le niveau de bruit de fond a été défini grâce à l'utilisation du phage sauvage fd ou après compétition avec un excès d'anticorps solubles appropriés (Fig. 3, insert). Par ailleurs, les phages P-K^d-fd peuvent être immunopurifiés de manière efficace à l'aide d'un tube en plastique recouvert de l'anticorps monoclonal 20.8.4S dirigé contre K^d (utilisé à la concentration de 10 µg/ml dans 0.5 ml pour l'immobilisation). La fraction de c.f.u. retirée par immunopurification (par rapport à la quantité initialement introduite dans le tube) était respectivement de 0.25%, 0.38% pour HA-K^d-fd et pour Cw3-K^d-fd alors l'immunopurification sur des protéines de lait seul ne permettait pas d'immunopurifier plus de 0.001% de phages. D'une manière intéressante, la fraction de HA-K^d-fd sélectionnée après immunopurification décroît de 0.25% à 0.04% quand le phage a été produit à 37°C au lieu de 30°C.

Le nombre de molécules fonctionnelles P-K^d présenté par phages infectieux a été déterminé grâce à 3 différents types d'expériences.

a- La concentration des molécules K^d correctement repliée a été déterminée dans les suspensions de phages par un test de sandwich ELISA, comme dans le cas de la molécule K^d soluble (110 et 17 ng/l de culture bactérienne pour HA-K^d-fd et CW3-K^d-fd, respectivement). Du point de vue de la molarité, ceci correspond à environ 0.01 et 0.015 molécules de CMH par unité infectieuse de phages, respectivement.

b- L'interaction du phage avec les anticorps monoclonaux anti-K^d et 57-D1, ce dernier étant spécifique de la partie N-terminale de g3p, a été comparée (Fig. 4a). Pour obtenir le même signal ELISA (c'est-à-dire le même nombre de
5 phages attachés au plastique) il était nécessaire d'introduire 100 fois plus de phages quand ceux-ci étaient immobilisés avec n'importe lequel des anticorps anti-K^d (environ 10⁹ c.f.u./ml) que lorsque les anticorps anti-g3p étaient utilisés (1x10⁷ c.f.u./ml). Comme contrôle, des
10 phages P-K^d-fd ayant été immunopurifiés au préalable sur des anticorps anti-K^d immobilisés (et qui donc expriment tous au moins une molécule K^d par phage), sont, dans ce cas, aussi réactifs vis-à-vis de l'anti-g3p que de l'anti-K^d (Fig. 4a).

c- L'immunopurification des phages K^d-fd sur des
15 tubes recouverts d'anticorps anti-K^d 20.8.4S était environ 60 fois moins efficace que sur des tubes recouverts d'anti-g3p (0.12% contre 7.4%).

Donc, on peut estimer qu'environ 1 à 2% de
phages P-K^d-fd présentent à leur surface au moins une
20 molécule fonctionnelle P-K^d.

L'analyse par Western Blot des protéines des phages a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal qui interagit avec le domaine C-terminal de g3p (Fig. 4b). Cette
25 analyse a révélé deux bandes principales (voir la ligne HA-K^d-fd) : une bande de poids moléculaire de 70 kDa indistincte de la bande observée dans la préparation de protéine du phage sauvage fd (référence 26), et une bande de masse moléculaire d'environ 76 kDa, qui pourrait résulter de
30 la cassure de la protéine de fusion près du domaine C-terminal du domaine α3 de K^d. La bande attendue correspondant à la protéine de fusion complète HA-K^d-g3p

(d'une masse moléculaire d'environ 110 KDa) est visible sur des gels étant chargés avec 30 fois plus de matériel (résultats non montrés) ou quand les phages sont au préalable immunopurifiés contre un anticorps anti-K^d immobilisé (voir la ligne HA-K^d-fd IP). Il est important de noter, que la proportion respective des bandes de 110 KDa, 76 KDa et 60 KDa au sein des préparations des phages immunopurifiés étaient d'environ 1:2:2. Une fragmentation similaire, mais moins importante, de la protéine contrôle anticorps simple chaîne fusionnée à g3p fut aussi observée, dans ce cas, une protéine de fusion complète (de taille d'environ 90 KDa), pouvait être observée sans purification préalable (voir la ligne scAb-fd dans la figure). En plus d'un clivage protéolytique possible, on peut suspecter l'existence d'un deuxième site d'interaction pour le Ribosome au sein de la séquence codant pour le domaine ₃ de K^d. Ce site d'initiation alternatif permettant la transcription de la protéine mesurant 76 KDa pourrait être supprimé par mutagenèse dirigée.

20

Il était enfin très important de démontrer que les phages exprimant des complexe P-CMH covalents pouvaient se fixer spécifiquement à un TCR.

La figure 5 montre que c'est la cas, par exemple en utilisant le phage Cw3-K^d-fd. La figure 5a montre que les phages Cw3-K^d-fd interagissent avec le TCR simple chaîne spécifique de Cw3 et restreint à K^d. L'interaction de ce TCR Cw3-1.1 avec les phages sauvages fd, ou bien avec des phages présentant K^d mais des peptides "irrelevants" (HA ou PbCs) est moins bonne. Aucun des phages utilisés n'interagissent avec le TCR monochaîne KB5-C20, qui est lui restreint à la molécule H-2K^b, quand celui-ci est immobilisé sur le plastique à la même concentration. La figure 5B montre que des concentrations 100 fois supérieures de phages Cw3- K^d-fd

30

sont nécessaires pour obtenir le même signal ELISA (c'est-à-dire la même quantité de phages immobilisés sur le plastique) en présence de TCR Cw3-1.1 (environ 10^{11} c.f.u./ml) qu'en présence d'anticorps anti- K^d (environ 10^9 c.f.u./ml).

Pour étudier l'influence du peptide antigénique présenté par les phages P- K^d -fd sur leur interaction avec le TCR Cw3-1.1, on a mesuré en parallèle l'interaction des phages Cw3- K^d -fd et les phages HA- K^d -fd (figure 5c). Bien que les deux types de phages recombinants sont capables d'interagir avec le TCR, 3 fois moins de c.f.u. du phage Cw3- K^d -fd sont nécessaires pour induire le même signal ELISA, démontrant que le peptide présenté module d'une manière spécifique l'avidité du phage pour le TCR.

Afin d'exclure l'hypothèse selon laquelle les phages Cw3- K^d -fd interagissent mieux que les phages HA- K^d -fd car ils présenteraient plus de molécule K^d , des courbes d'activité anti- K^d -fd ont été obtenues dans des expériences parallèles (Fig. 5, insert) et superposées en corrigeant d'un facteur 2.1 les titres de phages Cw3- K^d -fd reportés en abscisse dans la Figure 5C. Avec ou sans (résultats non montrés) cette correction, les phages Cw3- K^d -fd interagissent 3 à 6 fois mieux que les phages HA- K^d -fd avec le TCR Cw3-1.1.

9. Expression de complexe P-CMH à la surface de phages - deuxième méthode.

Cette méthode permet également d'exprimer des complexes P-CMH à la surface de phages. Dans cet exemple, les Inventeurs se sont intéressés à exprimer les complexes P- K^d covalents liés à la protéine g8p grâce à un vecteur de type phagemide (Fig. 1A, pAb8) et à caractériser les complexes obtenus.

Les clones bactériens transfectés avec le vecteur HA-K^d-pAb8 ont été multipliés par culture à 37°C en milieu 2YT comprenant 100 µg/ml d'ampicilline, 10 g/l de glucose jusqu'à ce que la culture atteigne une densité optique de 0.9 à 600 nm. Après centrifugation, les bactéries ont été remises en culture pendant 1 heure à 37°C en l'absence de glucose mais en présence de 10¹¹ c.f.u. de phage helper VCSM13 (Stratagene), qui porte la résistance à la kanamycine. Après ajout de kanamycine (50 µg / ml), la culture est prolongée sur la nuit à 30°C. Les particules de phages sont récupérées comme décrit dans l'exemple 8.

Les phages HA-K^d-M13 exprimant le peptide antigénique HA réalisés d'après ce protocole ont été obtenus avec un bon titre (> 10¹¹ c.f.u. / l). Ces phages, mais pas les phages VCSM13, expriment les épitopes spécifiques de K^d reconnus par l'anticorps 20.8.4S ainsi qu'il a été mesuré dans un ELISA en tout point identique à celui de l'exemple 8. Les densités optiques (moyenne ± déviation standard, n = 3) observées à 450 nm sont représentées dans le tableau 1.

Phage	Anticorps	Densité optique
HA-K ^d -M13	20.8.4S	1.075 ± 0.133
	aucun	0.020 ± 0.005
VCSM13	20.8.4S	0.032 ± 0.010
	aucun	0.027 ± 0.005

Tableau 1

Ces résultats montrent que les complexes P-CMH exprimés par cette méthode sont présents à la surface du phage et correctement repliés.

10. Expression de complexes P-CMH présentant différents enchaînements des domaines du CMH.

Cette méthode permet d'exprimer des complexes P-CMH présentant différents enchaînements des domaines du CMH.

5 Dans cet exemple, les Inventeurs se sont intéressés à exprimer des complexes HA-K^d formés de différents enchaînements des domaines de K^d liés à la protéine g8p selon le protocole de l'exemple 9 et à caractériser les complexes obtenus.

10 Les densités optiques (dans un ELISA en tout point identique à celui de l'exemple 9) observées à 450 nm sont représentées dans le tableau 2 (moyenne \pm déviation standard, n =3):

<i>Enchaînement</i>	<i>Densité optique</i>
$\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-L-\beta 2m$	0.275 ± 0.080
$\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3$	0.682 ± 0.130
$\alpha 1-\alpha 2-\beta 2$	0.231 ± 0.051
$\alpha 1-\alpha 2$	0.127 ± 0.009
VCSM13 contrôle	0.033 ± 0.026

Tableau 2

15

Ces résultats indiquent que pour tous les enchaînements testés, les complexes P-CMH s'expriment de façon analogue à la surface du phage et sont correctement repliés.

20

11. Expression de complexe P-CMH non covalents.

Cette méthode permet d'exprimer des complexes P-CMH non covalents. Dans cet exemple, les Inventeurs se sont intéressés à exprimer dans un premier cas des complexes HA-K^d

25 et POL-A2 non covalents liés à la protéine g3p ou la protéine g8p et à caractériser les complexes obtenus.

Selon le protocole de l'exemple 4, les séquences alternatives codant pour le peptide HA et le peptide de liaison (Fig. 1C) ont été assemblées dans le vecteur pAb8 pour obtenir le vecteur HA-pAb8. De même, les séquences alternatives codant pour le peptide POL et le peptide de liaison ont été assemblées dans le vecteur pAb8 pour obtenir le vecteur POL-pAb8. La même opération a été effectuée avec dans le vecteur fd-med pour obtenir les vecteurs HA-fd et POL-fd.

10 Dans un premier temps, les phages HA-fd et POL-fd ont été produits selon le protocole de l'exemple 8 à partir des vecteurs HA-fd et POL-fd, respectivement. De même, les phages HA-M13 et POL-M13 ont été produits selon le protocole de l'exemple 9 à partir des vecteurs HA-pAb8 et
15 POL-pAb8 respectivement.

Dans un deuxième temps, 1 ml des solutions de phages (typiquement 10^{11} c.f.u. / ml) obtenues ont été incubés pendant 12 heures à 25°C puis pendant 48 heures à 4°C avec de la molécule de CMH soluble produite
20 indépendamment (1 μ g / ml) puis conservé à 4°C. L'incubation a été conduite dans une chambre de dialyse munie d'une membrane perméable à moins de 10 KDa (Slide-A-Lyser, Pierce). La molécule K^d a été aimablement fournie par le Dr Abastado, de l'Institut Pasteur à Paris (6). La molécule
25 HLA-A2 a été obtenue d'après la méthode de Garboczi et al (5).

La Figure 6A montre par un test ELISA identique à celui décrit dans l'exemple 9 que les phages K^d-HA-M13 (exprimant le complexe non covalent HA-K^d lié à la g8p), et
30 K^d-HA-fd (exprimant le complexe non covalent HA-K^d lié à la g3p) sont capables de se lier à un anticorps anti-K^d immobilisé. De même, la Figure 6B montre que les phages A2-POL-M13 (exprimant le complexe non covalent POL-A2 lié à la g8p) et A2-POL-fd (exprimant le complexe POL-A2 non

covalents liés à la g3p) sont également capables de se lier à un anticorps anti-A2 immobilisé.

12. Méthode de criblage de peptide antigénique.

5 Cette méthode de criblage consiste à mettre en présence des phages exprimant une diversité de peptides antigéniques sous forme de complexe P-CMH et un TCR, à laver les phages non liés spécifiquement, à détacher les phages fixés spécifiquement, et à récupérer la séquence
10 nucléotidique codant pour le peptide.

Les Inventeurs ont donc procédé à un cycle de sélection de phage décrits dans l'exemple 8 d'après leur capacité à lier le TCR immobilisé Cw3-1.1. Les phages (typiquement 10^{10} - 10^{11} c.f.u.) ont été incubés pendant 2
15 heures à la température de la pièce dans des tubes en plastique ou dans des micro-puits recouverts pendant la nuit avec une solution de TCR soluble ou d'anticorps monoclonaux (1 à 10 μ g/ml dans du PBS). Après 5 lavages en PBS-Tween et 2 lavages en PBS, les phages restant attachés au polystyrène
20 ont été élués de la phase solide par traitement à l'acide (50 mM glycine-HCl, 0.75 M NaCl, pH 2.8 pendant 5 min.), l'éluat a été ensuite neutralisé par addition de Tris-HCl 1 M pH 7.4. La quantité de phages libres ou élués a été titrée de manière parallèle.

25 La figure 5D montre que les phages qui expriment le peptide Cw3 spécifique du TCR (Cw3-K^d-fd) sont enrichi 4 fois plus que les phages les phages K^d exprimant le peptide HA irrelevant. De plus, cet enrichissement est spécifique dans la mesure où les phages Cw3-K^d-fd ne sont pas enrichis
30 par un cycle de sélection sur un TCR KB5-C20 ou sur des protéines du lait immobilisées en phase solide. Les phages Cw3-K^d-fd récupérés après liaison au TCR ont pu infecter des bactéries TG1, et leur séquence nucléotidique a pu être amplifiée par PCR dans la région d'intérêt.

13. Méthode de marquage et de tri de cellules.

Cette méthode de marquage de cellules exprimant des TCR consiste à incuber les phages présentant un complexe
5 P-CMH avec les cellules puis à révéler les cellules spécifiques grâce aux phages liés.

En conséquence, les Inventeurs ont mis en présence, dans un volume de 100 μ l et pendant 4 heures à 4°C, les phages Kd-HA-g8p obtenus selon le protocole de
10 l'exemple 11 (10^{10} c.f.u.) avec les cellules 2D4, dérivées de la lignée BW- (42) dans laquelle les gènes du TCR spécifique du peptide HA et restreint à K^d ont été transfectés. Les cellules ont été lavées à 4°C, puis les phages fixés aux cellules ont été révélés par 1 μ g
15 d'anticorps anti-phage biotiné puis, après un second lavage, avec 1 μ g de streptavidine phycoerythrine (Sigma). La Figure 6B montre que seules les cellules 2D4 sont marquées par les phages et que ce marquage est inhibé en présence d'un excès (10 μ g) d'anticorps anti-K^d 20-8-4S.

20

14. Méthode de stimulation des cellules T.

Cette méthode de stimulation de cellules T spécifique d'un complexe P-CMH consiste à incuber un complexe P-CMH immobilisé avec les cellules puis à révéler
25 l'activation des cellules T spécifiques.

Dans cet exemple les Inventeurs se sont intéressé à étudier la stimulation de cellules T spécifiques du complexe HA-K^d par différents complexes P-K^d immobilisés et exprimant les variants du peptide HA en position 4 et 6
30 (dénommés peptides HAX46) décrits à l'exemple 5.

Les phages produits par différents clones de bactéries transfectées par le vecteur HAX46-K^d-pAb8 selon le protocole de l'exemple 9 ont été immobilisés sur du

plastique d'une plaque à micro-puits par simple absorption. Après lavage, les cellules T spécifiques ont été distribuées et leur stimulation a été mesurée comme décrit à l'exemple 7..

- 5 On a ensuite ajouté dans les puits 50 μ l d'une suspension de bactéries TG1, puis après une incubation de 1 heure à 37°C, les bactéries ont été étalées sur des plaques de cultures contenant de l'ampicilline. La séquence de l'ADN codant pour le peptide antigénique a été déterminé d'une
- 10 part dans les puits donnant une stimulation supérieure à 5 10^4 cpm (groupe positif, voir Fig. 2C), d'autre part dans les puits donnant une stimulation inférieure à 2 10^4 cpm (groupe négatif). Sur 18 séquences obtenues dans le groupe 1, 15
- 15 codaient pour une glycine en position 6, mutation connue pour améliorer la stimulation des ces cellules T (Liblau R, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, observations non publiées). Sur 18 séquences obtenues dans le groupe 2, seulement une codait pour ce résidu en cette position. Ces résultats indiquent qu'il est possible d'observer
- 20 l'activation spécifique des cellules T avec les complexes P-CMH immobilisé.

REFERENCES.

- 1- Wilson IA, Garcia KC. Curr Opin Struct Biol 1997. Dec;7(6):839-48. T-cell receptor structure and TCR
5 complexes.
- 2- Jones EY. Curr Opin Immunol 1997 Feb;9(1):75-9. MHC class I and class II structures.
- 10 3- Rammensee HG. Curr Opin Immunol 1995 Feb;7(1):85-96. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules.
- 15 4- Margulies DH. Curr Opin Immunol 1997 Jun;9(3):390-5. Interactions of TCRs with MHC-peptide complexes: a quantitative basis for mechanistic models.
- 20 5- Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Apr 15;89(8):3429-33. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in Escherichia coli and complexed with single antigenic peptides.
- 25 6- Godeau F, Luescher IF, Ojcius DM, Saucier C, Mottez E, Cabanie L, Kourilsky P. J Biol Chem 1992 Dec 5;267(34):24223-9. Purification and ligand binding of a soluble class I major histocompatibility complex molecule consisting of the first three domains of H-2Kd fused to beta 2-microglobulin expressed in the
30 baculovirus-insect cell system.
- 35 7- Scott CA, Garcia KC, Carbone FR, Wilson IA, Teyton L. J Exp Med 1996 May 1;183(5):2087-95. Role of chain pairing for the production of functional soluble IA major histocompatibility complex class II molecules.

8- Kozono H, White J, Clements J, Marrack P, Kappler J. Nature 1994 May 12;369(6476):151-4. Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides.

9- Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Science 1996 Oct 4;274(5284):94-6. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.

10- Hemmer B, Vergelli M, Pinilla C, Houghten R, Martin R. Immunol Today 1998 Apr;19(4):163-8. Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries.

11- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. Science 1991 Dec 13;254(5038):1643-7. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.

12- Sanderson S, Campbell DJ, Shastri N. J Exp Med 1995 Dec 1;182(6):1751-7. Identification of a CD4+ T cell-stimulating antigen of pathogenic bacteria by expression cloning.

13- Rodi DJ, Makowski L. Curr Opin Biotechnol 1999 Feb;10(1):87-93. Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack.

14- Smith GP. Science 1985 Jun 14;228(4705):1315-7. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.

- 15- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Nature 1990 Dec 6;348(6301):552-4. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains.
- 16- Dunn IS. Curr Opin Biotechnol 1996 Oct;7(5):547-53. Phage display of proteins.
- 17- Bothmann H, Pluckthun A. Nat Biotechnol 1998 Apr;16(4):376-80. Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression.
- 18- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Protein Eng 1997 Jan;10(1):1-6. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.
- 19- Beck E, Sommer R, Auerswald EA, Kurz C, Zink B, Osterburg G, Schaller H, Sugimoto K, Sugisaki H, Okamoto T, Takanami M. Nucleotide sequence of bacteriophage fd DNA. Nucleic Acids Res 1978. Dec;5(12):4495-503.
- 20- Schneider G, Wrede P. Biophys J 1994 Feb;66(2 Pt 1):335-44. The rational design of amino acid sequences by artificial neural networks and simulated molecular evolution: de novo design of an idealized leader peptidase cleavage site.
- 21- Keen NT, Tamaki S. J Bacteriol 1986 Nov;168(2):595-606. Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*.

22- Betton JM, Hofnung M. EMBO J 1994 Mar 1;13(5):1226-34. In vivo assembly of active maltose binding protein from independently exported protein fragments.

5 23- Maina CV, Riggs PD, Grandea AG 3d, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, Guan CD. Gene 1988 Dec 30;74(2):365-73. An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein.

10 24- Petersen G, Song D, Hugle-Dorr B, Oldenburg I, Bautz EK. Mol Gen Genet 1995 Dec 10;249(4):425-31. Mapping of linear epitopes recognized by monoclonal antibodies with gene-fragment phage display libraries.

15 25- Rubenstein JL, Brice AE, Ciaranello RD, Denney D, Porteus MH, Usdin TB. Nucleic Acids Res 1990 Aug 25;18(16):4833-42. Subtractive hybridization system using single-stranded phagemids with directional inserts.

20 26- Mottez E, Langlade-Demoyen P, Gournier H, Martinon F, Maryanski J, Kourilsky P, Abastado JP J Exp Med 1995 Feb 1;181(2):493-502. Cells expressing a major histocompatibility complex class I molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic.

27- Greenwood J, Willis AE, Perham RN. J Mol Biol 1991 Aug 20;220(4):821-7. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein as antigens.

28- Matthews DJ, Wells JA. Science 1993 May 21;260(5111):1113-7. Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display.

29- Nakayama GR, Valkirs G, McGrath D, Huse WD.
Immunotechnology 1996 Sep;2(3):197-207. Improving the copy
numbers of antibody fragments expressed on the major coat
5 protein of bacteriophage M13.

30- Sambrook et al. 1989. Molecular Cloning, A
Laboratory Manual.

10 31- Fisch I, Kontermann RE, Finnern R, Hartley
O, Soler-Gonzalez AS, Griffiths AD, Winter G. Proc Natl Acad
Sci U S A 1996 Jul 23;93(15):7761-6. A strategy of exon
shuffling for making large peptide repertoires displayed on
filamentous bacteriophage.

15 32- Hart SL, Knight AM, Harbottle RP, Mistry A,
Hunger HD, Cutler DF, Williamson R, Coutelle C. J Biol Chem
1994 Apr 29;269(17):12468-74. Cell binding and
internalization by filamentous phage displaying a cyclic
20 Arg-Gly-Asp-containing peptide.

33- Adey NB, Mataragnon AH, Rider JE, Carter JM,
Kay BK. Gene 1995 Apr 14;156(1):27-31. Characterization of
phage that bind plastic from phage-displayed random peptide
25 libraries.

34- Gregoire C, Malissen B, Mazza G. Eur J
Immunol 1996 Oct;26(10):2410-6. Characterization of T cell
receptor single-chain Fv fragments secreted by myeloma
30 cells.

35- Morgan DJ, Liblau R, Scott B, Fleck S,
McDevitt HO, Sarvetnick N, Lo D, Sherman LA. J Immunol 1996
Aug 1;157(3):978-83. CD8(+) T cell-mediated spontaneous
35 diabetes in neonatal mice.

36- Arakawa F, Kuroki M, Kuwahara M, Senba T, Ozaki H, Matsuoka Y, Misumi Y, Kanda H, Watanabe T

J Biochem (Tokyo) 1996 Sep;120(3):657-62.

- 5 Cloning and sequencing of the VH and V kappa genes of an anti-CD3 monoclonal antibody, and construction of a mouse/human chimeric antibody.

- 37- Braciale TJ, Braciale VL, Winkler M, Stroynowski I, Hood L, Sambrook J, Gething MJ. J Exp Med 1987 Sep 1;166(3):678-92. On the role of the transmembrane anchor sequence of influenza hemagglutinin in target cell recognition by class I MHC-restricted, hemagglutinin-specific cytolytic T lymphocytes.

15

38- Casanova JL, Cerottini JC, Matthes M, Necker A, Gournier H, Barra C, Widmann C, MacDonald HR, Lemonnier F, Malissen B, et al. J Exp Med 1992 Aug 1;176(2):439-47. H-2-restricted cytolytic T lymphocytes specific for HLA display T cell receptors of limited diversity.

20

- 39- Romero P, Eberl G, Casanova JL, Cordey AS, Widmann C, Luescher IF, Corradin G, Maryanski JL. J Immunol 1992 Mar 15;148(6):1871-8. Immunization with synthetic peptides containing a defined malaria epitope induces a highly diverse cytotoxic T lymphocyte response. Evidence that two peptide residues are buried in the MHC molecule.

25

- 40- Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. Nucleic Acids Res 1991 Aug 11;19(15):4133-7. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains.

30

41- Abastado JP, Lone YC, Casrouge A, Boulot G,
Kourilsky P. J Exp Med 1995 Aug 1;182(2):439-47.
Dimerization of soluble major histocompatibility complex-
peptide complexes is sufficient for activation of T cell
5 hybridoma and induction of unresponsiveness.

42- Donnadieu E, Trautmann A, Malissen M, Trucy
J, Malissen B, Vivier E. J Biol Chem 1994 Dec
30;269(52):32828-34. Reconstitution of CD3 zeta coupling to
10 calcium mobilization via genetic complementation.

15

20

25

30

REVENDICATIONS

1) Micro-organisme génétiquement modifié
5 caractérisé en ce qu'il présente à sa surface un ou
plusieurs complexe(s) P-CMH.

2) Micro-organisme selon la revendication 1,
caractérisé en ce qu'il s'agit d'un phage.

10

3) Procédé de préparation d'un micro-organisme
selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce
qu'on exprime le(s) complexe(s) P-CMH dans ledit micro-
organisme par le procédé d'expression comprenant les étapes
15 suivantes :

a) la préparation d'une séquence nucléotidique
comprenant d'une part une séquence codant successivement
pour un peptide signal, un peptide antigénique, un peptide
de liaison, un ou des domaines extracellulaires d'un ou
20 ~~plusieurs produits du CMH, et d'autre part une séquence~~
fonctionnelle,

b) le clonage de la séquence nucléotidique
obtenue en (a) dans un vecteur permettant l'expression de
ladite séquence dans un micro-organisme,

25 c) la transfection d'un micro-organisme avec un
vecteur obtenu à l'étape (b),

d) l'induction de l'expression du produit de la
séquence nucléotidique par tout moyen approprié.

30 4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé
en ce que le peptide antigénique et le(s) domaine(s)
extracellulaire(s) de produits du CMH sont liés de manière
covalente par le peptide de liaison.

5) Procédé selon les revendications 3 et 4, caractérisé en ce que la séquence codant pour le peptide signal est une séquence codant pour un peptide permettant l'export de la protéine de fusion dans le périplasme du micro-organisme.

6) procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la séquence codant pour le peptide signal est la séquence du peptide signal de la protéine pectine lyase B d'E. Coli.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que la séquence codant pour le peptide antigénique utilisée dans la séquence nucléotidique de l'étape (a) est :

- soit une séquence naturelle provenant de l'ADNc d'un tissu, d'une culture cellulaire, d'un virus, d'une organelle ou d'un organisme déterminé,
- soit une séquence nucléotidique aléatoire de synthèse.

8) Procédé de préparation d'un micro-organisme selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on exprime le(s) complexe(s) P-CMH dans ledit micro-organisme par le procédé d'expression comprenant les étapes suivantes :

a') la préparation d'une séquence nucléotidique codant successivement pour un peptide signal, un peptide antigénique, un peptide de liaison directement relié à une séquence fonctionnelle,

b) le clonage de la séquence nucléotidique obtenue en (a') dans un vecteur permettant l'expression des dites séquences dans un micro-organisme,

c) la transfection d'un microorganisme avec un vecteur obtenu à l'étape (b),

d) l'induction de l'expression du produit de la séquence nucléotidique par tout moyen approprié,

e) la formation de complexe P-CMH en mettant en contact le produit d'expression obtenu en (d) avec un ou
5 plusieurs produits du CMH exprimés indépendamment.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le peptide antigénique et le(s) domaine(s) extracellulaire(s) de produits du CMH sont liés de manière
10 non covalente, mais fonction de l'affinité des peptides antigéniques pour le CMH.

10) Procédé de production d'un complexe P-CMH soluble, caractérisé en ce que :

15 on exprime un ou plusieurs complexes P-CMH par les procédés selon l'une quelconques des revendications 3 à 9, dans lesquels la séquence fonctionnelle utilisée à l'étape (a) ou (a') code pour un peptide étiquette et un codon stop,

20 on récupère après l'étape (d) ou (e') le complexe P-CMH par tout moyen connu de l'homme du métier.

11) Complexe P-CMH soluble obtenu par un procédé selon la revendication 10.

25

12) Utilisation d'un complexe selon la revendication 11 pour marquer et trier des cellules T spécifiques d'un ou plusieurs complexes P-CMH.

30

13) procédé de marquage et de tri des cellules T caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

i) on met en présence :

un excès d'un complexe P-CMH soluble porteur d'un peptide étiquette, obtenu par un procédé selon l'une
35 des revendications 3 à 9, et

un "pool" de récepteurs de cellules T,

ii) on sélectionne les complexes P-CMH liés spécifiquement aux récepteurs de cellules T de l'étape (i) en éliminant par tout moyen approprié l'excès de P-CMH soluble n'étant pas lié de manière spécifique,

iii) on marque les complexes P-CMH liés aux récepteurs de cellules T sélectionnés à l'étape (ii) à l'aide d'une sonde spécifique du complexe P-CMH,

iv) on repère par tout moyen approprié les récepteurs de cellules T marqués à l'étape (iii).

14) Utilisation d'un complexe selon la revendication 11, préférentiellement sous forme immobilisée, pour la préparation d'une composition diagnostique et/ou vaccinale utile pour moduler de manière spécifique l'activité des cellules T.

15) Procédé de production d'un complexe P-CMH, présenté à la surface d'un micro-organisme, caractérisé en ce que :

on exprime un ou plusieurs complexes P-CMH par les procédés selon l'une quelconques des revendications 3 à 9, dans lesquels la séquence fonctionnelle utilisée à l'étape (a) ou (a') code pour une protéine permettant la présentation du complexe P-CMH à la surface du micro-organisme,

on récupère après l'étape (d) ou (e) le complexe P-CMH par tout moyen connu de l'homme du métier.

16) Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le micro-organisme est un phage.

17) Procédé selon l'une des revendications 15 à 16, caractérisé en ce que la protéine permettant la présentation du complexe P-CMH à la surface du micro-

organisme est la protéine majeure (G8P) ou mineure (G3P) du manteau du phage.

18) Utilisation d'un phage obtenu par le procédé
5 selon l'une des revendications 16 ou 17 pour le marquage et le tri de cellules T spécifiques d'un ou plusieurs complexes P-CMH, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

i') on met en présence :
10 un excès de phages présentant à leur surface un complexe P-CMH,

un "pool" de récepteurs de cellules T,
ii') on sélectionne les récepteurs de cellules T
liés spécifiquement avec les phages portant les complexes P-
15 CMH de l'étape (i') en éliminant par tout moyen approprié l'excès de phage n'étant pas lié de manière spécifique,

iii') on marque les récepteurs de cellules T
liés aux phages sélectionnées à l'étape (ii') à l'aide d'une sonde spécifique du phage,

20 iv') on récupère par tout moyen approprié les récepteurs de cellules T marqués à l'étape (iii').

19) Utilisation d'un phage obtenu par le procédé
selon l'une des revendications 16 à 17, préférentiellement
25 sous forme immobilisée, pour la préparation d'une composition diagnostique et/ou pharmaceutique utile pour moduler de manière spécifique l'activité des cellules T.

20) Banques de micro-organismes obtenues selon
30 le procédé de l'une quelconques des revendication 10, 11, 15, 16 ou 17.

21) Utilisation des banques de micro-organismes
selon la revendication 20 pour le criblage de peptides
35 antigéniques à l'aide d'un récepteur de cellules T donné.

22) Procédé de criblage de peptides antigéniques, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

5 i'') on met en présence une banque de micro-organismes selon la revendication 20, et un récepteur de cellules T défini, sous forme soluble ou à la surface de cellules T,

10 ii'') on sélectionne les phages présentant le complexe P-CMH liés de manière spécifique avec le récepteur T de l'étape (i'') en éliminant les phages qui ne sont pas liés de manière spécifique par tout moyen approprié,

 iii'') on récupère par tout moyen approprié

15 23) Peptides antigéniques obtenus par le procédé de criblage selon la revendication 22.

20 24) Utilisation d'un peptide selon la revendication 23 pour la préparation d'une composition diagnostique et/ou pharmaceutique utile pour moduler de manière spécifique l'activité des cellules T.

1/6

Fig 1:

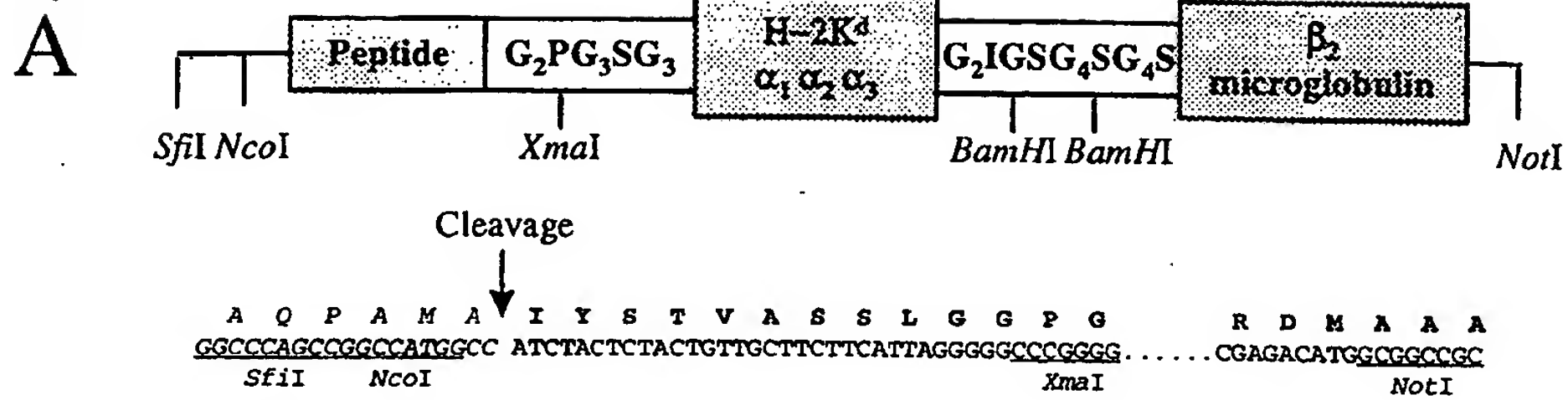


Fig. 1 :

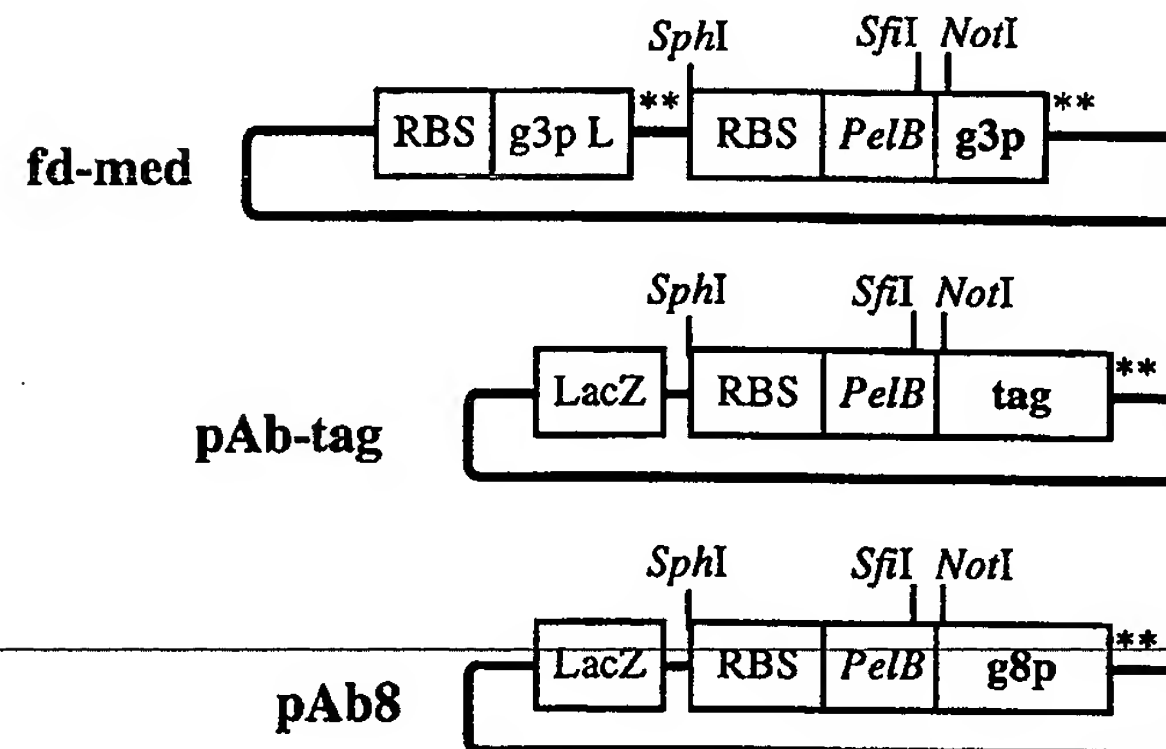
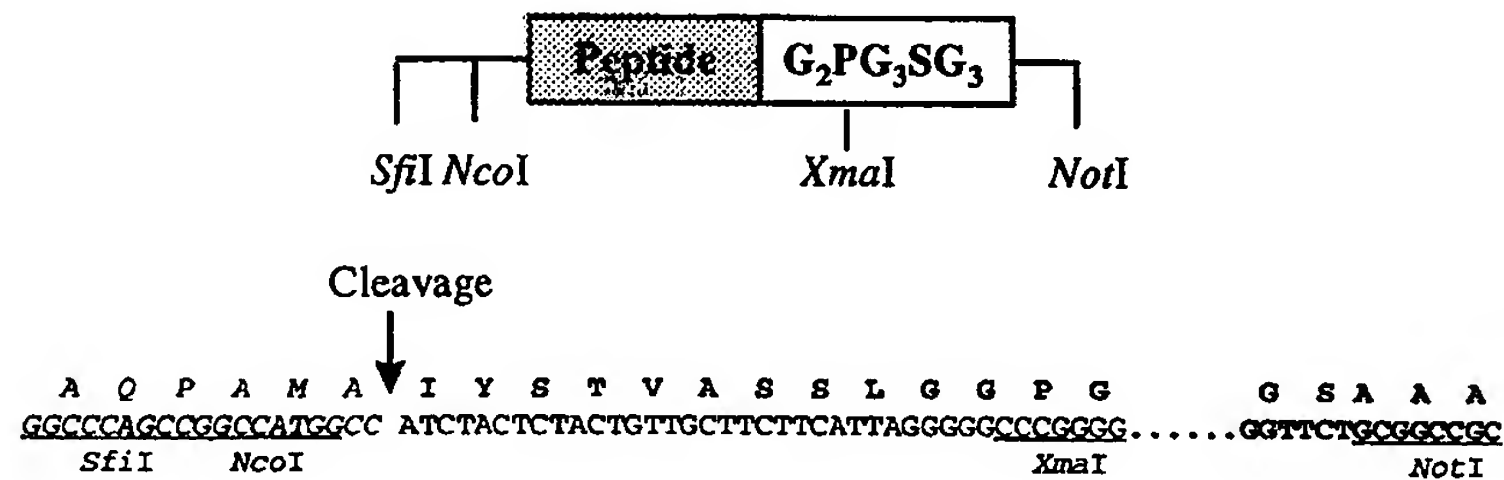
B

Fig. 1 :

C

2/6

Fig. 2

Fig. 2 a

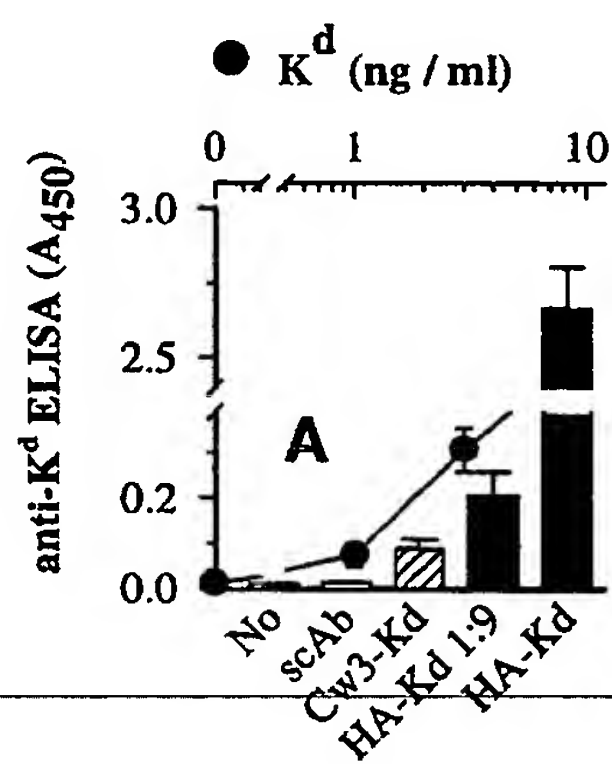


Fig. 2 b

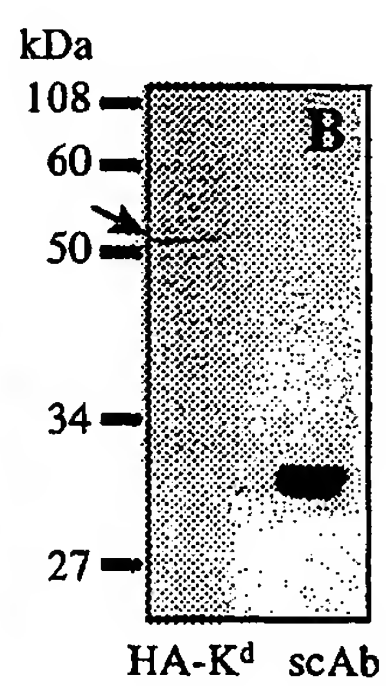
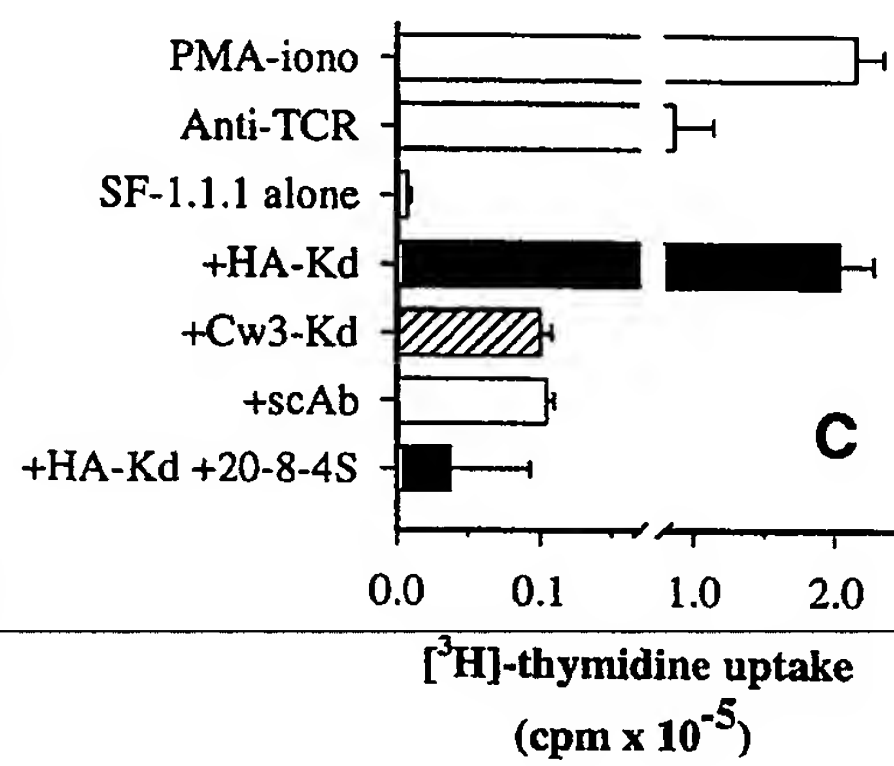
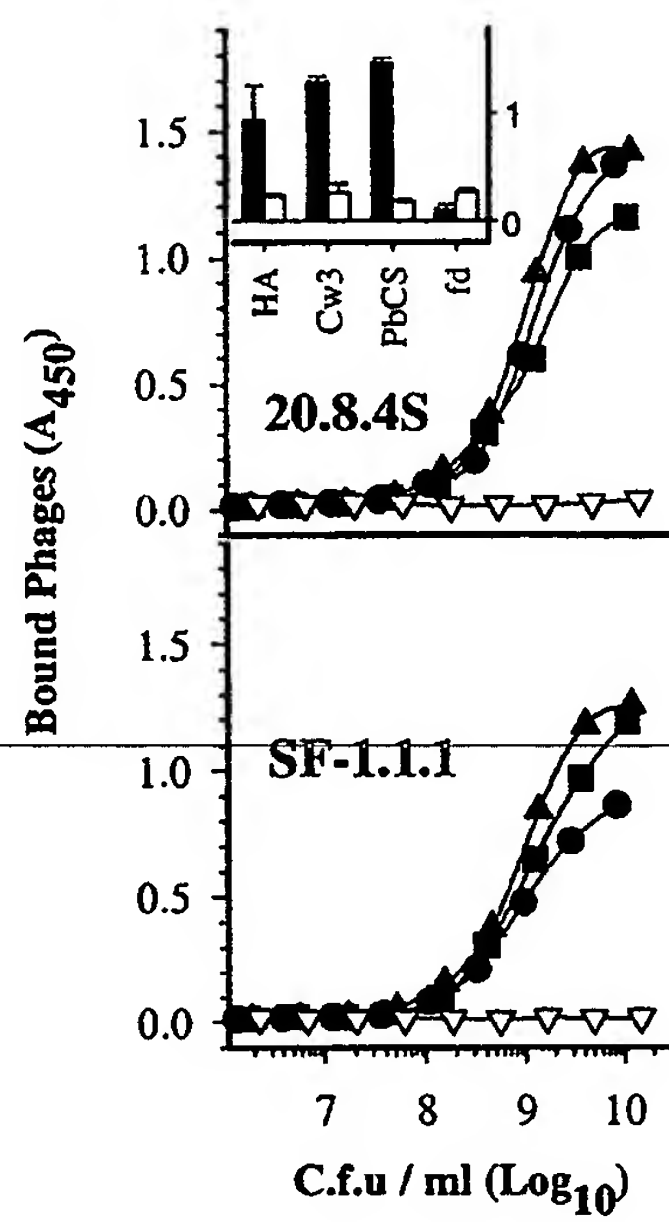


Fig. 2 c



3/6

Fig. 3



4/6

Fig. 4

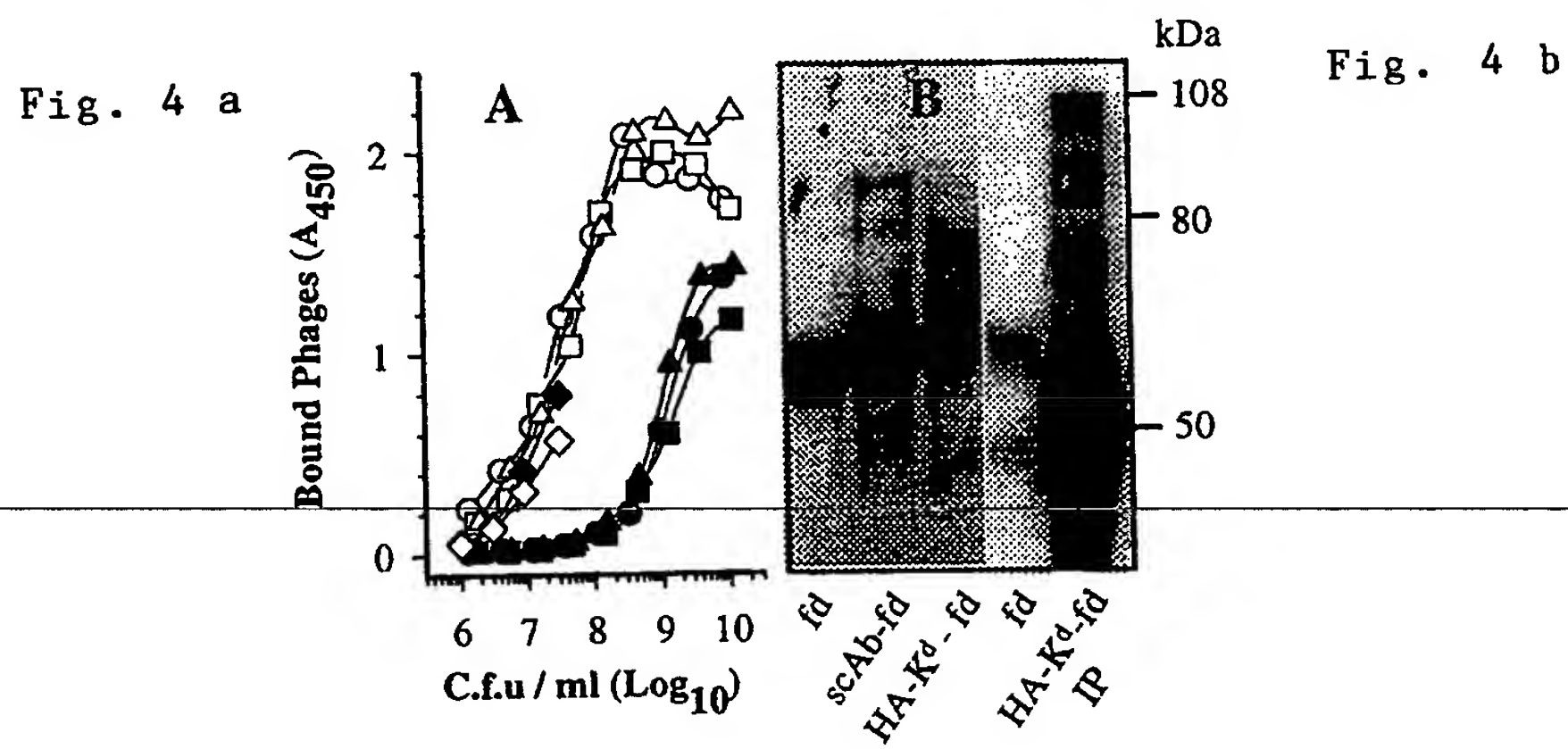


Fig. 5 a

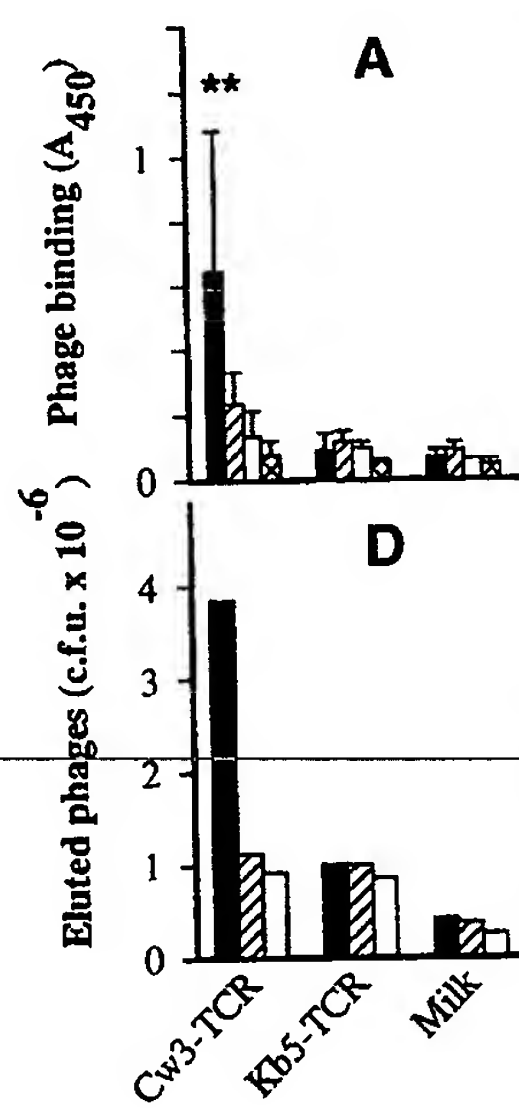


Fig 5 b

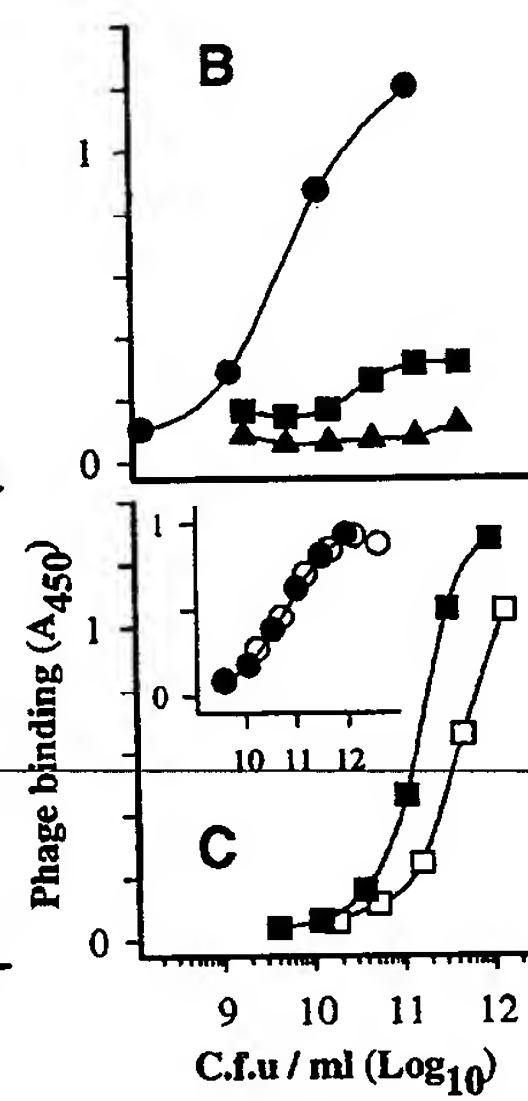


Fig. 5 d

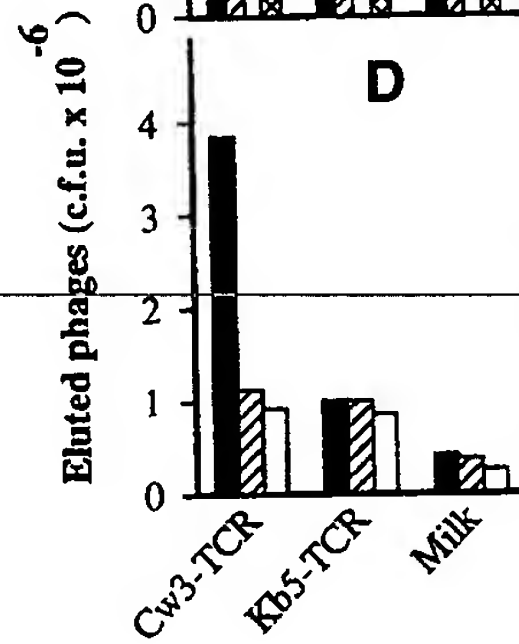
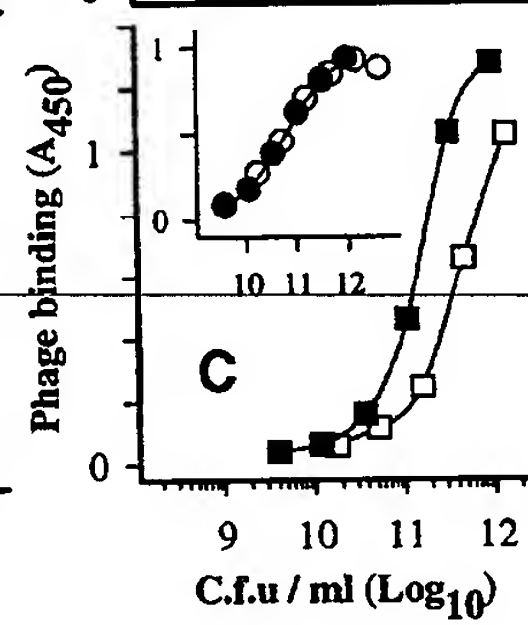
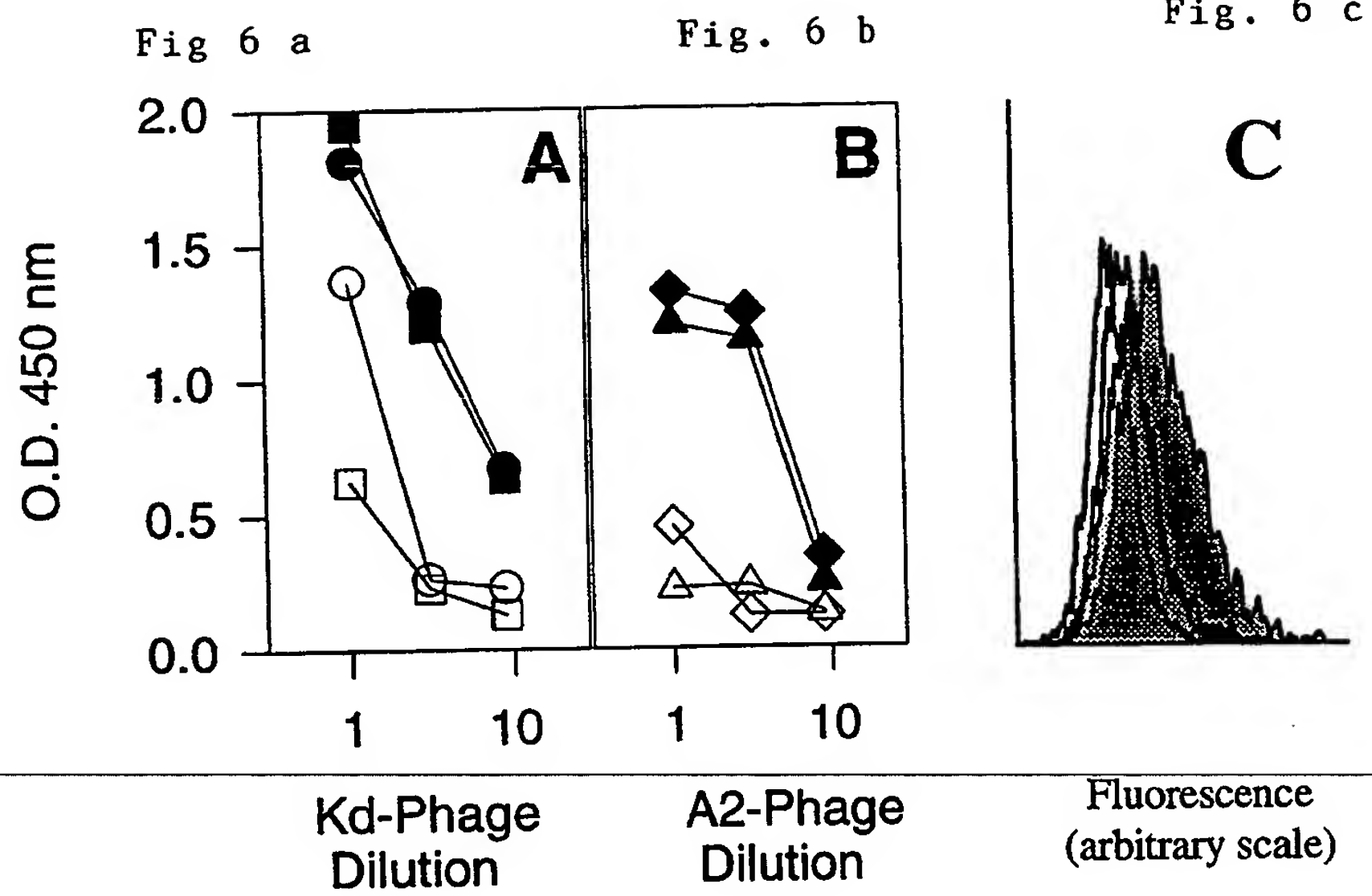


Fig. 5 c



6/6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/FR 99/01147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/62 C07K14/705 C07K16/00 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 06749 A (STROMINGER JACK L ; WUCHERPFENNIG KAI W (US); HARVARD COLLEGE (US)) 19 February 1998 see the whole document ---	3,4,7,8, 10-14
X	WO 98 03552 A (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER) 29 January 1998 see abstract see page 2, line 22 - page 4, line 24 see examples 1,2	1,3,4, 7-15,20, 21
X	WO 97 08328 A (US HEALTH ; ROSENBERG AMY SONYA (US)) 6 March 1997 see the whole document --- -/--	1,3,4, 7-15,20, 21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 1999

Date of mailing of the international search report

15/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01147

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 40944 A (ZYMOGENETICS INC ;ANERGEN INC (US)) 19 December 1996 see abstract see page 4, line 25 - page 8, line 1 see page 13, line 19 - page 18, line 7 see page 18, line 17 - page 24, line 25 see page 26, line 36 - page 34, line 4 see page 35, line 21 - line 30 see examples 1,3,4,6 * claims *</p> <p>---</p>	<p>3,4,7,8, 10-14</p>
X	<p>WO 96 04314 A (DADE INTERNATIONAL INC.) 15 February 1996 see abstract see page 1, line 8 - line 18 see page 3, line 25 - page 8, line 24 see page 12, line 10 - page 43, line 4 see figures 1-7 see examples 2-6,9-17</p> <p>---</p>	<p>1,3,4, 7-15,20, 21</p>
X	<p>US 5 734 023 A (CLARK BRIAN R ET AL) 31 March 1998 see abstract see column 3, line 1 - line 22 see column 4, line 10 - line 24 see column 6, line 16 - column 7, line 64 see column 10, line 24 - line 30 see column 12, line 24 - column 14, line 64</p> <p>---</p>	<p>1,3,4, 7-14, 20-24</p>
X	<p>WO 91 12332 A (INST NAT SANTE RECH MED) 22 August 1991 see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1,3,4,7, 10-14, 20-24</p>
X	<p>DE 42 24 542 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM) 27 January 1994 see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1,3,7-14</p>
X	<p>WO 97 02342 A (KOEbenhavns UNIVERSITET) 23 January 1997 see abstract see page 4, line 5 - page 16, line 20 see page 17, line 12 - page 23, line 8</p> <p>---</p>	<p>1-24</p>
X	<p>WO 97 15669 A (US HEALTH) 1 May 1997 see abstract see page 7, line 19 - page 9, line 17 see figures 1,2</p> <p>-----</p>	<p>1,2,5,6, 8,10-14, 17-20,23</p>
	<p>see abstract see page 7, line 19 - page 9, line 17 see figures 1,2</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/FR 99/01147

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9806749 A	19-02-1998	AU 4072397 A	06-03-1998
WO 9803552 A	29-01-1998	AU 3664597 A EP 0914347 A	10-02-1998 12-05-1999
WO 9708328 A	06-03-1997	AU 7010996 A	19-03-1997
WO 9640944 A	19-12-1996	AU 6331696 A CA 2224205 A EP 0833930 A	30-12-1996 19-12-1996 08-04-1998
WO 9604314 A	15-02-1996	AU 696177 B AU 3403995 A CA 2196085 A EP 0776339 A JP 10503379 T	03-09-1998 04-03-1996 15-02-1996 04-06-1997 31-03-1998
US 5734023 A	31-03-1998	AU 3220693 A CA 2123228 A EP 0661996 A JP 7501526 T WO 9309810 A	15-06-1993 27-05-1993 12-07-1995 16-02-1995 27-05-1993
WO 9112332 A	22-08-1991	FR 2658197 A CA 2051651 A EP 0468049 A JP 4505401 T	16-08-1991 15-08-1991 29-01-1992 24-09-1992
DE 4224542 A	27-01-1994	NONE	
WO 9702342 A	23-01-1997	AU 6353596 A EP 0835306 A	05-02-1997 15-04-1998
WO 9715669 A	01-05-1997	AU 7472496 A	15-05-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande Internationale No
PCT/FR 99/01147

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/62 C07K14/705 C07K16/00 A61K38/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 98 06749 A (STROMINGER JACK L ; WUCHERPFENNIG KAI W (US); HARVARD COLLEGE (US)) 19 février 1998 voir le document en entier ---	3, 4, 7, 8, 10-14
X	WO 98 03552 A (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER) 29 janvier 1998 voir abrégé voir page 2, ligne 22 - page 4, ligne 24 voir exemples 1, 2	1, 3, 4, 7-15, 20, 21
X	WO 97 08328 A (US HEALTH ; ROSENBERG AMY SONYA (US)) 6 mars 1997 voir le document en entier --- -/--	1, 3, 4, 7-15, 20, 21

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 juin 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/07/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 99/01147

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 96 40944 A (ZYMOGENETICS INC ; ANERGEN INC (US)) 19 décembre 1996 voir abrégé voir page 4, ligne 25 - page 8, ligne 1 voir page 13, ligne 19 - page 18, ligne 7 voir page 18, ligne 17 - page 24, ligne 25 voir page 26, ligne 36 - page 34, ligne 4 voir page 35, ligne 21 - ligne 30 voir exemples 1,3,4,6 * claims *</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,4,7,8, 10-14
X	<p>WO 96 04314 A (DADE INTERNATIONAL INC.) 15 février 1996 voir abrégé voir page 1, ligne 8 - ligne 18 voir page 3, ligne 25 - page 8, ligne 24 voir page 12, ligne 10 - page 43, ligne 4 voir figures 1-7 voir exemples 2-6,9-17</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,3,4, 7-15,20, 21
X	<p>US 5 734 023 A (CLARK BRIAN R ET AL) 31 mars 1998 voir abrégé voir colonne 3, ligne 1 - ligne 22 voir colonne 4, ligne 10 - ligne 24 voir colonne 6, ligne 16 - colonne 7, ligne 64</p>	1,3,4, 7-14, 20-24
X	<p>voir colonne 10, ligne 24 - ligne 30 voir colonne 12, ligne 24 - colonne 14, ligne 64</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 91 12332 A (INST NAT SANTE RECH MED) 22 août 1991 voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p>DE 42 24 542 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM) 27 janvier 1994 voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 97 02342 A (KOEbenhavns UNIVERSITET) 23 janvier 1997 voir abrégé voir page 4, ligne 5 - page 16, ligne 20 voir page 17, ligne 12 - page 23, ligne 8</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 97 15669 A (US HEALTH) 1 mai 1997</p>	1,3,4,7, 10-14, 20-24
X	<p>voir abrégé voir page 7, ligne 19 - page 9, ligne 17 voir figures 1,2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,3,7-14
X		1-24
X		1,2,5,6, 8,10-14, 17-20,23
	voir abrégé voir page 7, ligne 19 - page 9, ligne 17 voir figures 1,2	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

rande internationale No

PCT/FR 99/01147

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9806749 A	19-02-1998	AU 4072397 A	06-03-1998
WO 9803552 A	29-01-1998	AU 3664597 A	10-02-1998
		EP 0914347 A	12-05-1999
WO 9708328 A	06-03-1997	AU 7010996 A	19-03-1997
WO 9640944 A	19-12-1996	AU 6331696 A	30-12-1996
		CA 2224205 A	19-12-1996
		EP 0833930 A	08-04-1998
WO 9604314 A	15-02-1996	AU 696177 B	03-09-1998
		AU 3403995 A	04-03-1996
		CA 2196085 A	15-02-1996
		EP 0776339 A	04-06-1997
		JP 10503379 T	31-03-1998
US 5734023 A	31-03-1998	AU 3220693 A	15-06-1993
		CA 2123228 A	27-05-1993
		EP 0661996 A	12-07-1995
		JP 7501526 T	16-02-1995
		WO 9309810 A	27-05-1993
WO 9112332 A	22-08-1991	FR 2658197 A	16-08-1991
		CA 2051651 A	15-08-1991
		EP 0468049 A	29-01-1992
		JP 4505401 T	24-09-1992
DE 4224542 A	27-01-1994	AUCUN	
WO 9702342 A	23-01-1997	AU 6353596 A	05-02-1997
		EP 0835306 A	15-04-1998
WO 9715669 A	01-05-1997	AU 7472496 A	15-05-1997